

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Jemima Eline Xavier da Silva Barros

**Estudo clínico, molecular e citogenético de tumores
embrionários (Neuroblastoma, Tumor de Wilms,
Retinoblastoma, Meduloblastoma)**

Recife, 2014

Jemima Eline Xavier da Silva Barros

**Estudo clínico, molecular e citogenético de tumores
embrionários (Neuroblastoma, Tumor de Wilms,
Retinoblastoma, Meduloblastoma)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz

Coorientador: Profa. Dra. Neide Santos

Recife, 2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Barros, Jemima Eline Xavier da Silva

Estudo clínico, molecular e citogenético de tumores embrionários (Neuroblastoma, Tumor de Wilms, Retinoblastoma, Meduloblastoma) / Jemima Eline Xavier da Silva Barros. – Recife: O Autor, 2014.

169 folhas: il.

Orientador: Maria Tereza Cartaxo Muniz, Neide Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Genética, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Câncer 2. Tumores 3. Cromossomos I. Muniz, Maria Tereza Cartaxo (orient.) II. Santos, Neide III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-259

Jemima Eline Xavier da Silva Barros

**Estudo clínico, molecular e citogenético de tumores embrionários
(Neuroblastoma, Tumor de Wilms, Retinoblastoma,
Meduloblastoma)**

Aprovado em 11 / 03 / 2014

Banca Examinadora:

**Profa. Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz
Universidade de Pernambuco**

**Dra. Cláudia Esther Alicia Rocio Hassan
Instituto Nacional do Câncer**

**Dra. Adriana Vieira Gomes
Universidade de Pernambuco**

**Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco**

**Prof. Dr. Rafael Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco**

Recife, 2014

Dedico esse trabalho a todos aqueles que lutam ou lutaram contra o câncer e as suas famílias, que participam da batalha sem medir esforços.

Dedico às crianças com câncer que, mesmo tão inocentes, já vivem uma luta de “gente grande” e, mesmo assim, continuam sendo crianças, sorrindo e ensinando a viver.

Dedico aos profissionais de saúde que se entregam de coração, que trabalham com amor, acolhendo com carinho a quem tanto precisa.

Dedico esse trabalho a minha família, que viveu essa luta e aos que nos deixaram saudades...

Agradecimentos

O futuro pertence àqueles que acreditam na grandeza dos seus sonhos. No entanto, a satisfação da conquista não se restringe apenas em alcançá-la, mas sim em encontrar pessoas que nos incentivem e tornem possível a sua realização. Muitas pessoas participaram desta conquista, dentre as quais agradeço especialmente:

A Deus, pela vida e por tudo que me proporciona. Aos meus pais por me fazerem sentir a perfeição, a força e a determinação de um amor sem limites. A minha tia-mãe Roseli e a minha família, são minha fortaleza e refúgio. Ao meu esposo, Mário Calado, pelo amor, paciência, compreensão e valiosa ajuda. Aos amigos agradeço o carinho, a fidelidade e compreensão por minhas ausências.

A minha orientadora Profa. Tereza Cartaxo por me acolher como sua aluna com paciência e carinho. A minha co-orientadora, Profa. Neide Santos, pelo carinho e disposição em ajudar, além das contribuições tão valiosas. À Dra. Terezinha Salles pelo exemplo de força e amor ao trabalho, por me acolher desde o primeiro dia, pela confiança, carinho, incentivo e por toda ajuda. A Eliane por todos os ensinamentos e paciência, pelo exemplo de dedicação e organização. À Profa Teresa Marquim, pela amizade, carinho e companheirismo de todas as horas. A vocês dedico a minha admiração e respeito.

Às amigas Betânia, Marina e Elker Lene, pelo companheirismo, amizade e apoio. Aos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho, Dyego, Madalena, Elker Lene, Eros, Cássia, Helena, Helker e Adriana. Aos companheiros dos laboratórios do CEOHNPE.

À Dra. Vera pelo exemplo de dedicação, força e amor ao que faz, agradeço também pela paciência em sua tão importante contribuição para esse trabalho. A Inalda, Soraya, Ana e demais funcionários do CEONHPE por todo suporte dado com tanto carinho. Ao GRAAC pelo conhecimento transmitido.

O meu profundo agradecimento às crianças e seus responsáveis por permitir a realização deste trabalho, por me confiarem a sua história e a amostra biológica cedida.

Aos professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Genética pelos conhecimentos transmitidos, em especial a Marcos André Bezerra, Rafael Guimarães e Paulo Eleotério por todas as contribuições em avaliações de Qualificação e Pré-banca. Agradeço também toda ajuda daqueles que fazem parte da coordenação e secretaria do Programa.

Agradeço aos meus amigos de turma do Doutorado, em especial à Anna Carolina Almeida, Felipe Lira, Neidoca Xavier e Márcia Schneider pelo companheirismo, cumplicidade, amizade, carinho, sorrisos discontraídos para aliviar o estresse do dia-a-dia e por tudo que aprendi.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!
Jemima Eline Barros

“Há um tempo que é preciso esquecer os caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”

Fernando Pessoa

Resumo

Os tumores embrionários constituem importante causa de morte em crianças, cujos fatores de risco, possíveis causas e mecanismos etiopatogênicos são pouco conhecidos. Visando contribuir para identificação de fatores de suscetibilidade e prognóstico, esse estudo teve por objetivo avaliar fatores biológicos, clínicos, moleculares e citogenéticos em crianças com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma, atendidas no Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Foram estudados 51 pacientes com neuroblastoma, 141 com retinoblastoma, 97 com tumor de Wilms e 51 com meduloblastoma quanto ao sexo, idade, queixas, localização do tumor, estadiamento, metástases, níveis de desidrogenase láctica e amplificação do gene *n-myc*, e analisados quanto à sobrevida. Análises moleculares e citogenéticas foram realizadas em amostras de sangue periférico, tumor fresco e parafinado. Alguns fatores influenciaram de forma estatisticamente significativa para menor sobrevida e pior prognóstico dos pacientes, entre eles: o sexo feminino, o estadiamento e os níveis de desidrogenase láctica em pacientes com neuroblastoma; a disseminação da doença e o estadiamento em pacientes com retinoblastoma; metástases e recidivas em pacientes com meduloblastoma. Nenhum dos parâmetros estudados parece influenciar na sobrevida de pacientes com tumor de Wilms. Apenas o alelo *MTR* 2756A parece ter influência para uma menor sobrevida em pacientes com retinoblastoma. Outros marcadores não apresentaram informação preditiva significativa no prognóstico de tumores neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma. Polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *SLC19A1* e *TYMS* foram analisados em pacientes com os tumores estudados e em controles. Os polimorfismos do gene *SLC19A1* ($p=0,0286$) em neuroblastoma e do gene *MTHFR* A1298C ($p=0,0270$) em tumor de Wilms mostraram-se estatisticamente significantes, indicando que os portadores dos genótipos AA e do alelo C apresentam 5,17 e 2,8 vezes mais chance de desenvolver neuroblastoma e tumor de Wilms, respectivamente. A análise citogenética clássica revelou um caso de retinoblastoma agressivo associado a alterações cromossômicas não relatadas anteriormente, bem como alterações comuns ao neuroblastoma, envolvendo regiões 2p, 1q e 17q. As técnicas de extração e FISH em amostras parafinadas foram aplicadas em 41, 28 e 10 pacientes com retinoblastoma, tumor de Wilms e neuroblastoma respectivamente. 24,4% apresentaram deleção de *RB1*, sendo 60% bilaterais, sugerindo associação com a forma hereditária da doença. Alterações envolvendo *WT1* e *WT2* foram observadas em 10,7% dos casos. Um caso revelou três sinais *WT1* e *WT2*, podendo estar associado à dissomia uniparental e duplicações. A análise de dados clínicos, moleculares e citogenéticos em crianças com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma permitiu determinar fatores prognósticos e identificar fatores de risco para a sobrevida desses pacientes, contribuindo para a identificação de características de tumores sólidos na infância. Entretanto, novos estudos são necessários para avaliar o impacto dessas variáveis no tratamento de crianças com câncer.

Palavras-chave: Tumores embrionários; sobrevida; folato; alterações cromossômicas.

Abstract

The embryonic tumours constitute important cause of death in children, whose risk factors, possible causes and etiopathogenic mechanisms are little known. To contribute to identification of susceptibility and prognosis factors, this study evaluated biological, clinical, molecular and cytogenetic factors in children with neuroblastoma, retinoblastoma, Wilms tumor and medulloblastoma, accompanied in Oncohematologia Pediatric Center of the Oswaldo Cruz Academic Hospital. Have been studied 51 patients with neuroblastoma, 141 with retinoblastoma, 97 with Wilm's tumor and 51 with medulloblastoma as to sex, age, complaints, tumor location, staging, metastasis, lactate dehydrogenase levels and n-myc amplification gene, and analyzed with respect to survival. Samples of peripheral blood, waxed and fresh tumor was submitted to molecular and cytogenetics analysis. Some factors influenced so statistically significant for lower survival and worse prognosis of patients, among them: the female sex, the staging and lactate dehydrogenase levels in patients with neuroblastoma; the spread of the disease and the staging in patients with retinoblastoma; metastases and recurrences in patients with medulloblastoma. None of the studied parameters seems to influence the survival of patients with Wilms tumor. Only the *MTR* 2756A allele may have influence for a smaller survival of patients with retinoblastoma. Other markers not revealed predictive significant information on the prognosis of neuroblastoma, retinoblastoma, Wilms tumor and medulloblastoma. Were studied *MTHFR*, *MTR*, *RFCh* and *TYMS* in patients and controls. The *SLC19A1* ($p=0,0286$) polymorphisms gene in neuroblastoma and the 1298C allele ($p=0,0270$) in wilm's tumor showed to be statistically relevant, indicating that patients with genotype AA and AC exhibit 5.17 and 2.8 times more chance of developing neuroblastoma and wilms tumor, respectively. The classical cytogenetics analysis showed a case with aggressive RB associated with chromosomal changes not previously reported, as well as common changes to neuroblastoma, as involving regions 2p, 1q and 17q. The extraction and FISH techniques in waxed samples were applied in 41, 28 and 10 patients with retinoblastoma, wilm's tumor and neuroblastoma respectively. 24,4% presented deletion of RB1, being 60% bilateral. It suggest that the deletion can be associated with the inherited form of retinoblastoma. Changes involving *WT1* and *WT2* were observed in 10,7% cases. A case showed three signs *WT1* and *WT2*. It can associated to uniparental disomy and duplications. The analysis of clinical, molecular and cytogenetic data in children with neuroblastoma, retinoblastoma, Wilms tumor and medulloblastoma allowed determine prognostic factors and identify risk factors for the survival of these patients, contributing to the identification of characteristics of solid tumors in childhood. However, further studies are needed to evaluate the impact of these variables in the treatment of children with cancer.

Key words: Embryonic tumors; survival; folate; chromosomal changes

Lista de Ilustrações

Figura 1:	Diferentes apresentações clínicas de crianças com Neuroblastoma	05
Figura 2:	Manifestações clínicas em criança com retinoblastoma.	12
Figura 3:	Regulação do ciclo celular pela proteína retinoblastoma (pRB)	14
Figura 4:	Apresentação clínica em TW	22
Figura 5:	A localização do meduloblastoma.	29
Figura 6:	Via metabólica do ácido fólico em humanos	39
Figura 7:	Representação esquemática do gene <i>TYMS</i>	47
Figura 8:	Modelo proposto para o RFCh, mostrando todos os aminoácidos que compõem sua estrutura	50
Figura 9:	Processo de absorção do folato	51
Figura 10:	Análise de sobrevida dos pacientes com Neuroblastoma	90
Figura 11:	Análise de sobrevida dos pacientes com Retinoblastoma	93
Figura 12:	Análise de sobrevida dos pacientes com Tumor de Wilms	96
Figura 13:	Análise de sobrevida dos pacientes com Meduloblastoma	99
Figura 14:	Análise da Sobrevida e os polimorfismos do folato em pacientes com Neuroblastoma	105
Figura 15:	Análise da Sobrevida e os polimorfismos do folato em pacientes com Retinoblastoma	107
Figura 16:	Sobrevida dos pacientes com retinoblastoma em relação à presença do alelo mutante <i>MTR A2756G</i> .	108
Figura 17:	Análise da Sobrevida e os polimorfismos do folato em pacientes com tumor de Wilms	112
Figura 18:	Cariótipo de RASL (Neuroblastoma) obtido a partir de cultura de longa duração: (49-50,XY,add(2p),del(1q),del(17q),i(C),+C,+C,+C,-D,-G,+mar).	117
Figura 19:	Cariótipo de VASNN (Neuroblastoma) obtido a partir de cultura de longa duração: 46,XY,add(2p).	118
Figura 20:	Análise do paciente MVP através do Bandeamento G, FISH e SKY	118
Figura 21:	Identificando duas cópias do gene <i>n-myc</i> por FISH. A: DAPI. B: Texas Red	120
Figura 22:	Identificando três cópias do gene <i>n-myc</i> por FISH. A: DAPI. B: Texas Red	120
Figura 23:	Identificando quatro cópias do gene <i>n-myc</i> por FISH. A:DAPI. B:Texas red	120
Figura 24:	Identificação do gene RB1 através da análise por FISH.	122
Figura 25:	Identificação de uma cópia dos genes WT1 e WT2. A: DAPI. B: FITC. C. Texas Red.	124
Figura 26:	Análise por FISH, identificando duas cópias dos genes WT1 e WT2. A: DAPI. B: Texas Red, C. FITC.	124
Figura 27:	Análises de FISH identificando cópias extras do gene WT1 e WT2 no caso ILSPL. A: DAPI. B: FITC. C: Texas red.	124

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Sistema Internacional de Estadiamento do Neuroblastoma (INSS)	06
Tabela 2:	Fatores de valor prognóstico no Neuroblastoma	07
Tabela 3:	Classificação Internacional do Retinoblastoma	17
Tabela 4:	Estadiamento do Tumor de Wilms segundo a SIOP	28
Tabela 5:	Estadiamento para Meduloblastoma	36
Tabela 6:	Categorias de critério prognóstico do neuroblastoma segundo Cartom <i>et al.</i> (2004).	58
Tabela 7:	Características clínicas dos pacientes com Neuroblastoma	88
Tabela 8:	Características clínicas dos pacientes com Retinoblastoma	92
Tabela 9:	Características clínicas dos pacientes com Tumor de Wilms	95
Tabela 10:	Características clínicas dos pacientes com Meduloblastoma	99
Tabela 11:	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de genes envolvidos no metabolismo do folato analisados em pacientes com NB e controles livres de doença.	103
Tabela 12:	Distribuição genotípica e a sobrevida em pacientes com Neuroblastoma	104
Tabela 13:	Distribuição genotípica e a sobrevida em pacientes com Retinoblastoma	108
Tabela 14:	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de genes envolvidos no metabolismo do folato analisados em pacientes com TW e controles livres de doença.	110
Tabela 15:	Distribuição genotípica e sobrevida em pacientes com Tumor de Wilms	111
Tabela 16:	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de genes envolvidos no metabolismo do folato analisados em pacientes com MB e controles livres de doença.	113
Tabela 17:	Distribuição genotípica e sobrevida em pacientes com Meduloblastoma	116
Tabela 18:	Pacientes com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma submetidos à cultura de células de longa duração e resultados observados.	117
Tabela 19:	Tumores controle submetidos à cultura de células de longa duração e resultados observados.	119
Tabela 20:	Resultados da análise por citogenética molecular em amostras parafinadas de pacientes com neuroblastoma.	121
Tabela 21:	Resultados da análise por citogenética molecular em amostras parafinadas de pacientes com retinoblastoma.	121
Tabela 22:	Resultados da análise por citogenética molecular em amostras de tumor de Wilms parafinadas.	123

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

CCSG	Grupo de Estudo em Crianças com Câncer
CEONHPE	Centro de Oncohematologia Pediátrica
CIAP	Centro Integrado de Anatomia Patológica
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DHL	Desidrogenase Lática
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dTMP	Timidina Monofosfato
dUMP	Uridina Monofosfato
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
GCP2	Glutamato Carboxipeptidase 2
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IC	Intervalo de Confiança
INSS	Sistema Internacional de Estadiamento do Neuroblastoma
ISCN	Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMMJ	Leucemia Mielomonocítica Juvenil
MB	Meduloblastoma
MTR	Metionina Sintase
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato Redutase
MTRR	Metionina Sintase Redutase
MTX	Metrotexato
MTX	Metrotexato
NB	Neuroblastoma
NTD	Distúrbios do Tubo Neural
NWTS	<i>National Wilms' Tumor Study</i>
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-ASA	Amplificação Alelo Específica
PCR-RFLP	Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição
pRB	Proteína Retinoblastoma
QT	Quimioterapia
RB	Retinoblastoma
RB1	Gene Retinoblastoma 1
RFC	Carreador de Folato Reduzido
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido Riborribonucléico
RT	Radioterapia
SAM	S-Adenosilmetionina
SHMT	Serinahidroximetil Transferase
SIOP	International Society of Pediatric Oncology
SKY	Spectral Karyotyping
SNC	Sistema Nervoso Central
TA	Temperatura Ambiente
THF	Tetrahidrofolato
TMD1	Domínio Transmembrana
TYMS	Timidilato Sintase
TW	Tumor de Wilms
WT1, WT2 e WT3	Gene tumor de Wilms 1, 2 e 3
χ^2	Teste do Qui-quadrado
5,10-MTHF	5,10-metilenotetrahidrofolato
5-MTHFR	5-metiltetrahidrofolato

Sumário

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Ilustrações.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	xi
1. Introdução.....	01
2. Revisão da Literatura.....	03
2.1 Tumores malignos de origem embrionárias.....	03
2.1.1 Neuroblastoma.....	04
2.1.2 Retinoblastoma.....	11
2.1.3 Tumor de Wilms.....	21
2.1.4 Meduloblastoma.....	29
2.2 Tumores sólidos embrionários e polimorfismos de genes envolvidos na rota metabólica do folato.....	37
2.3 Estudos citogenéticos em tumores sólidos embrionários.....	56
3. Objetivos.....	65
3.1 Objetivo geral.....	65
3.2 Objetivos específicos.....	65
4. Material e Métodos.....	67
4.1 Local, período e desenho do estudo.....	67
4.2 Amostragem e estratégia de seleção dos casos.....	68
4.3 Considerações Éticas.....	69
4.4 Obtenção dos dados clínicos.....	70
4.5 Coleta do material biológico.....	70
4.6 Análise molecular.....	71
4.6.1 Extração de DNA de sangue periférico.....	71
4.6.2 Extração de DNA de tumor sólido a fresco.....	72
4.6.3 Extração de DNA a partir de tecido tumoral parafinado.....	73
4.6.4 Quantificação do DNA.....	75
4.6.5 Identificação dos polimorfismos.....	75

4.6.5.1 Determinação dos polimorfismos <i>MTHFR</i> C677T e A1298C.....	75
4.6.5.2 Determinação do polimorfismo <i>SLC19A1</i> G80A.....	77
4.6.5.3 Determinação do polimorfismo <i>TYMS</i>	78
4.6.5.4 Determinação do polimorfismo <i>MTR</i> A2756G.....	78
4.7 Análise citogenética convencional.....	79
4.7.1 Protocolo de incubação de células de tecido tumoral.....	79
4.7.2 Sincronização da cultura celular.....	80
4.7.3 Processamento da cultura.....	80
4.7.4 Preparação das lâminas para análise.....	81
4.8 Análise citogenética molecular.....	82
4.8.1 Preparação de lâminas.....	82
4.8.2 Extração de tecido tumoral armazenado em parafina.....	82
4.8.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente - FISH.....	83
4.8.3.1 Sondas utilizadas.....	83
4.8.3.2 Pré tratamento com Pepsina.....	83
4.8.3.3 Hibridização em amostras de retinoblastoma e neuroblastoma.....	84
4.8.3.4 Hibridização em amostras de tumor de Wilms.....	84
4.8.3.5 Lavagem pós hibridização e preparação para análise.....	85
4.9 Análise dos dados.....	86
5. Resultados.....	88
5.1 Resultados clínicos e análise da sobrevida.....	88
5.1.1 Neuroblastoma.....	88
5.1.2 Retinoblastoma.....	91
5.1.3 Tumor de Wilms.....	94
5.1.4 Meduloblastoma.....	97
5.2 Resultados da análise de polimorfismos.....	101
5.2.1 Neuroblastoma.....	102
5.2.2 Retinoblastoma.....	106
5.2.3 Tumor de Wilms.....	109
5.2.4 Meduloblastoma.....	113

5.3 Resultados da análise citogenética clássica e molecular.....	115
6. Discussão.....	125
7. Conclusões.....	140
8. Referências.....	142
Anexo 1.....	162
Anexo 2.....	164
Anexo 3.....	169
Anexo 4.....	211
Anexo 5.....	219

1. Introdução

Tumores embrionários são tumores sólidos originários de células precursoras de tecidos embrionários, cujos eventos de desenvolvimento e diferenciação são desregulados durante a fase fetal ou pós-natal. Esses tumores representam modelos que exemplificam a relação entre a embriogênese e a tumorigênese, sendo observados em eventos comuns a ambos os processos.

Entre os tumores embrionários mais representativos encontram-se os neuroblastomas, retinoblastomas, tumores de Wilms e meduloblastomas, originados a partir de mutações espontâneas em células do sistema nervoso simpático, da retina, do rim e do sistema nervoso central, respectivamente.

O conhecimento acerca desses tumores vem crescendo devido ao desenvolvimento de técnicas, como de cultura de tecidos, de biologia molecular e citogenética, resultando na identificação de novos genes e uma maior compreensão dos mecanismos de oncogênese, importantes na identificação de marcadores diagnósticos e de desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Entretanto, mais estudos são necessários na identificação de fatores de riscos relacionados à patogênese e desenvolvimento desses tumores, bem como de fatores genéticos de susceptibilidade e suas relações com polimorfismos genéticos e alterações cromossômicas.

Estudos envolvendo tumores sólidos, exceto os tumores cerebrais, já foram realizados e vários estudos avaliando casos e controles têm sugerido fatores de risco, tais como: uso de drogas, sexo, peso, infecções, ambiente social, exposição à pesticidas, etc. Porém, devido ao pequeno número de casos e a

inconstância dos padrões de exposição, tais estudos têm sido considerados inconclusivos.

Contudo, pesquisas demonstraram interações entre alguns polimorfismos genéticos e o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer. O estudo dos polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo de nutrientes essenciais, como o folato, vem contribuindo para a identificação de fatores de suscetibilidade gênica no desenvolvimento do câncer. Os genes envolvidos no metabolismo do folato são essenciais nos processos de metilação e atuam na síntese e reparo de DNA.

Além disso, a compreensão sobre o papel das alterações cromossômicas no desenvolvimento das neoplasias embrionárias vem emergindo a cada dia. Os estudos têm mostrado a importância clínica da análise dos cromossomos, principalmente como marcadores prognósticos potentes, pois permite a estratificação dos pacientes em grupos de risco, o que possibilita direcionar o tratamento e torná-lo mais eficaz.

Assim, novos estudos são necessários para estabelecer relações entre fatores de suscetibilidade e prognóstico com a origem ou progressão de tumores, determinando parâmetros que interfiram na sobrevivência das crianças com esses tumores. Portanto, visando contribuir para identificação de fatores de suscetibilidade, esse estudo avalia parâmetros biológicos, clínicos e laboratoriais (moleculares e citogenético) em crianças com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma, atendidas no Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz - Universidade de Pernambuco (CEONHPE/HUOC/UPE).

2. Revisão da Literatura

2.1 Tumores malignos de origem embrionária

As neoplasias embrionárias são tumores pediátricos originários de células primordiais que sofreram mutações espontâneas, levando ao descontrole dos processos de desenvolvimento e diferenciação durante as fases pré e pós natal (Abbaszadeh, 2010). Essas neoplasias possuem características anatomopatológicas semelhantes às fases do desenvolvimento do tecido de origem e, portanto, são importantes modelos biológicos para compreensão da relação entre eventos genéticos e de desenvolvimento, com a oncogênese e a progressão tumoral (Carr and Mitchell, 2005).

Tumores sólidos representam 40% das malignidades da infância, constituindo um problema de saúde global e uma importante causa de morte entre as crianças (Lukasa *et al.*, 2012). Embora a sobrevivência de pacientes com câncer infantil venha melhorando continuamente nas últimas décadas, a cura nos países em desenvolvimento é menor do que em países desenvolvidos, principalmente por causa de fatores sócioeconômicos e doença avançada ao diagnóstico. Assim, a avaliação de fatores que interferiram na sobrevivência das crianças com tumores embrionários torna-se importante na identificação das características locais da apresentação destas patologias (Harmon *et al.*, 2011; Ljungman *et al.*, 2011; Lukasa *et al.*, 2012).

Existem vários tipos de tumores embrionários, entre eles os neuroblastomas, retinoblastomas, tumores de Wilms e meduloblastomas, decorrentes da maturação patológica de células precursoras do sistema nervoso simpático, da retina, do rim e do sistema nervoso central, respectivamente (Abbaszadeh, 2010).

2.1.1 Neuroblastoma

Neuroblastoma (NB) é um tumor sólido extracraniano, que deriva da maturação patológica de células precursoras do sistema nervoso simpático, progenitoras da crista neural, a qual origina a medula adrenal e todos os gânglios e plexos simpáticos (Sridhar *et al.*, 2013).

Esse é o segundo tumor pediátrico mais frequente e o mais prevalente tumor sólido extra craniano em crianças menores de cinco anos, afetando uma a cada 6000-7000 crianças, sendo esta doença responsável por 15% de todas as mortes causadas por câncer da infância (Domingo-Fernandez *et al.*, 2013).

O NB é altamente heterogêneo, apresentando natureza agressiva e comportamento biológico imprevisível, podendo apresentar regressão espontânea dos tumores localizados, assintomáticos, ou exibir metástases, progressão rápida e resistência à terapia. Portanto, o NB representa um desafio de saúde grave para a oncologia pediátrica (Stigliani *et al.*, 2012).

As diversas características clínicas do NB são determinadas de acordo com seu local de origem. O fato desse tumor recapitular o desenvolvimento do sistema nervoso simpático permite que o NB possa originar-se em qualquer local do sistema simpático. O local primário mais frequente é o abdome, principalmente na região medular adrenal, seguindo pela cadeia paraespinal. Outros locais incluem o mediastino, pescoço e pélvis. Os principais sítios de metástases são medula óssea, fígado, pele e gânglios (Castleberry, 1997).

Essa neoplasia, na maioria das vezes, manifesta-se como massas abdominais duras, indolores e irregulares, podendo apresentar sinais relacionados à liberação de catecolaminas como sudorese, hipertensão arterial,

taquicardia, irritabilidade, rubor facial, e sinais relacionados à disseminação sistêmica, como dor óssea, anemia, sangramento, emagrecimento e nódulos subcutâneos (Figura1). Crianças com metástases retrobulbar comumente apresentam equimose palpebral e proptose do globo ocular (Castleberry, 1997; Schwab *et al.*, 2003; Weinstein *et al.*, 2003).

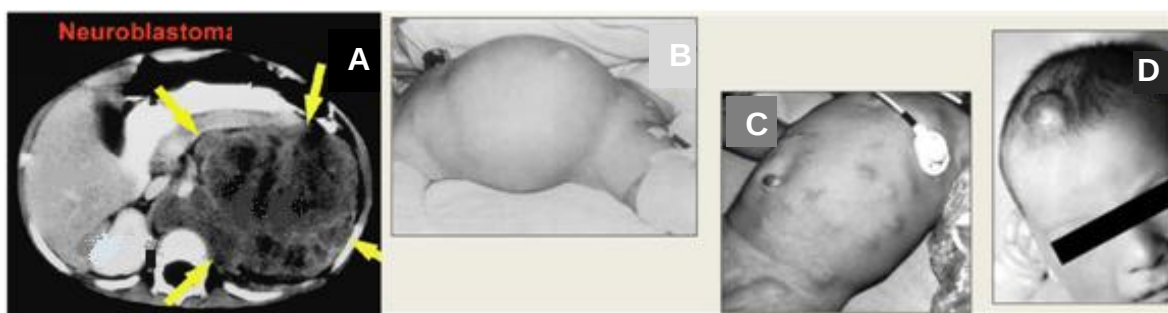


Figura 1: Diferentes apresentações clínicas de crianças com Neuroblastoma. **A.** Diagnóstico radiográfico; **B.** Criança com grande massa abdominal; **C** e **D.** Massas cutâneas associadas à doença. Fonte: [surgery.med.umich.edu/ .../neuroblastoma1.jpg](http://surgery.med.umich.edu/.../neuroblastoma1.jpg) and pediatricsurgerymd.org/AM.

Os sintomas mais comuns no NB são dor, febre e perda de peso, os quais dependem da massa tumoral e da extensão das metástases. Entretanto, em alguns casos, principalmente aqueles de menor estadiamento, podem apresentar-se assintomáticos e detectados incidentalmente (Schwab *et al.*, 2003).

O estadiamento do tumor é muito importante para precisar a extensão da doença, o que vai influenciar diretamente na escolha da estratégia de tratamento, bem como no prognóstico do paciente (Meller *et al.*, 2009). O Sistema Internacional de Estadiamento do Neuroblastoma (INSS) foi inicialmente desenvolvido em 1986 e revisado em 1993, sendo mundialmente utilizado, o que auxiliou no estabelecimento de um consenso internacional para um sistema de estadiamento e resposta à terapia (Weinstein *et al.*, 2003; Monclair *et al.*, 2009).

A diferenciação INSS entre os estadios baseia-se na excisão cirúrgica, envolvimento dos linfonodos e sítios metastáticos, sendo classificados em 1, 2A, 2B, 3, 4 e 4S, conforme observado na tabela 1 (Meller *et al.*, 2009).

Tabela 1: Sistema Internacional de Estadiamento do Neuroblastoma (INSS).

Estadio	Definição
1	Tumor localizado, confinado à área de origem; ressecção macroscopicamente completa, com ou sem doença residual microscópica; linfonodos ipsilaterais e contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico.
2A	Tumor localizado com ressecção incompleta; linfonodos ipsilaterais e contralaterais histologicamente negativos para tumor.
2B	Tumor localizado unilateral com ressecção completa ou incompleta, linfonodos ipsilaterais comprometidos. Linfonodos contralaterais livres de comprometimento neoplásico.
3	Tumor unilateral não ressecável infiltrando-se através da linha média*, com ou sem envolvimento de linfonodos regionais; ou tumor unilateral com envolvimento de linfonodos contralaterais; ou ainda tumor de linha média com extensão bilateral por infiltração (não ressecável) ou por envolvimento de linfonodos.
4	Metástases em linfonodos distantes, ossos, medula óssea, fígado, pele e/ou outros órgãos (exceto como definido pelo estágio 4S).
4S	Tumor primário localizado (como definido nos estádios 1, 2A ou 2B) com disseminação restrita à pele, fígado e/ou medula óssea**. Limitado a crianças < 1 ano de idade.

Fonte: Meller *et al.*, 2009

* A linha média é definida pela coluna vertebral. Tumores originários de um lado e atravessam a linha média infiltram para o lado oposto da coluna vertebral.

** O envolvimento da medula no estágio 4S pode ser mínimo, isto é < 10% do total de células nucleadas do sangue identificadas como malignas em biopsia de medula óssea ou em aspirado de medula. Envolvimento mais extensivo da medula pode ser considerado como estágio 4.

O estadio da doença é o fator prognóstico mais importante em crianças com neuroblastoma. Entretanto, o prognóstico desses pacientes está diretamente relacionado com vários outros fatores clínico, laboratoriais e biológicos. O curso clínico da doença é muito influenciado por fatores prognósticos, como idade, metástases, anormalidades genéticas, amplificação do oncogene *n-myc* e achados histológicos (Katherine *et al.*, 1999; Sridhar *et al.* 2013). Além disso, diversos parâmetros laboratoriais também têm sido considerados como auxiliares na definição do prognóstico da doença, como a ferritina e desidrogenase láctica (DHL) (Cartum *et al.*, 2004) (Tabela 2). Alguns desses fatores de prognóstico são usualmente empregados na análise de sobrevida (Leite *et al.*, 2007).

Tabela 2: Fatores de valor prognóstico no Neuroblastoma.

Fator Prognóstico		Favoráveis	Desfavoráveis
Fatores Clínicos	Estadiamento	1, 2 e 4S	3 e 4
	Idade	< 1 ano de idade	> 1 ano de idade
Histologia		Favorável	Desfavorável
Marcadores Tumorais	DHL	Baixo	Alto
	Ferritina	Baixo	Alto
	NSE	Baixo	Alto
Fatores Biológicos	Amplificação do <i>n-myc</i>	Cópias normais	Amplificação do oncogene
	Variações de ploidia	<i>near</i> -triplóide, hiperdiplóide	<i>near</i> -diplóides <i>near</i> -tetraplóides
	Alterações em 1p	Normal	Deleção
	Alterações em 17q	Normal	Ganho

Fonte: Weinstein *et al.*, 2003

As crianças menores de um ano de idade geralmente apresentam melhor evolução da doença e maiores taxas de sobrevida livre de doença (Tabela 2). Essas crianças frequentemente são portadoras de neuroblastoma de estadio 4S, o qual tem tendência à maturação espontânea e regressão com melhor prognóstico, apesar da disseminação da doença. Por esse motivo, é indicada apenas a observação do paciente e uso de terapia branda (Nickerson *et al.*, 2000).

As crianças maiores de um ano de idade e com doença disseminada, principalmente para os ossos, são as de pior prognóstico, com baixas taxas de sobrevivência, principalmente por causa de respostas ao tratamento ou recaídas. Além disso, cerca de 40% dos sobreviventes com NB avançado têm sequelas às terapias agressivas, ou seja, distúrbios endócrinos, catarata, hipertensão, bronquiolite, cegueira, neuropatia periférica, rim não funcional, colelitíase e nódulos da tireóide. Portanto, uma terapia adaptada ao risco, de acordo com o estadio da doença, pode diminuir a incidência de mortes devido a elevadas doses terapêuticas (Stigliani *et al.*, 2012).

Quanto à localização da doença, o NB abdominal representa um pior prognóstico que aqueles localizados em mediastino, região cervical e pélvica (Cartum *et al.*, 2004). Considerando as características do estroma e a idade do paciente ao diagnóstico, Shimada *et al.* (1984) classificam a histologia do NB em favorável e desfavorável. A histologia desfavorável está associada a uma doença clinicamente mais agressiva (Tabela 2) (Weinstein *et al.*, 2003).

Diversos marcadores moleculares são importantes na caracterização do potencial comportamento clínico do NB. Os marcadores mais conhecidos são a amplificação do gene *n-myc*; o conteúdo de DNA ou variações de ploidia;

alterações cromossômicas envolvendo as regiões 1p, 17q, 11q e 14q (Tabela 2); entre outros como a expressão do gene da tirosina kinase A, a atividade da telomerase e a expressão de CD44 (Weinstein *et al.*, 2003) .

A família gênica *MYC* codifica fatores de transcrição, cuja proteína possui papel importante na regulação transcricional. A ativação de sua função oncogênica se dá através do aumento do número de cópias do gene (amplificação), o que leva a uma competição com outros fatores de transcrição pela ligação às proteínas envolvidas no controle do ciclo celular. Dessa forma, a amplificação do gene e consequente aumento da expressão da proteína leva ao bloqueio da diferenciação celular e proliferação celular exarcebada (Conacci-Sorrell e Eisenman, 2011; Ma *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2013). A amplificação do gene *n-myc* ocorre em aproximadamente 20% dos neuroblastomas e está fortemente associada com a presença de doença metastática e pobre prognóstico, sugerindo que o gene *n-myc* contribui de forma crítica para o comportamento clinicamente agressivo de um NB de alto risco (Weinstein *et al.*, 2003; Attiyeh *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2010).

No que diz respeito à quantidade de DNA presente no núcleo da célula, tumores com cariótipo *near-triplóide* (69-81 cromossomos), *hiperdiplóide* (mais de 46 cromossomos) ou com alterações numéricas tem sido associados ao tipo favorável da doença, representando bom prognóstico. Em contraste, o tipo desfavorável é caracterizado por rearranjos estruturais, geralmente *near-diplóides* (47-68 cromossomos) ou *near-tetraplóides* (82-94 cromossomos), representando um tipo mais agressivo de pior prognóstico (Weinstein *et al.*, 2003; Janoueix-Lerosey *et al.*, 2009).

Os rearranjos cromossômicos mais comuns em NB incluem deleções em 1p, observadas em 36% dos casos de NB, em formas avançadas da doença e pior evolução; e deleções em 11q e em 14q, associadas a menor sobrevida livre de eventos em crianças cujos tumores não apresentavam amplificação do gene *n-myc*. Outras deleções associadas ao NB envolvem as regiões 4p, 6q, 10q, 19p e 19q. O gene *n-myc* localiza-se em 2p24 e estão associados a rápida progressão da doença e pobre prognóstico. Duplicações da região 17q é uma alteração comum em NB primário, presente em 70% dos tumores, sendo relacionado com estádios mais avançados e pior prognóstico (Weinstein *et al.*, 2003; Janoueix-Lerosey *et al.*, 2009; Mueller *et al.*, 2009; Sridhar *et al.* 2013).

Em relação aos parâmetros laboratoriais, o nível de desidrogenase láctica (DHL) no soro dos pacientes, ao diagnóstico, tem correlação com o prognóstico. Níveis sanguíneos maiores que 1500 U/mL ou 2,7 vezes o limite superior da normalidade estão associados à doença mais agressiva. Os elevados níveis enzimáticos refletem rápida multiplicação celular e/ou a presença de grandes massas tumorais. Adicionalmente, os níveis de ferritina sérica são clinicamente importantes em pacientes com NB. Crianças com níveis normais de ferritina sérica apresentam prognóstico melhor em relação às aquelas com níveis elevados. Além disso, raramente está alterada em crianças com doença localizada e, durante a remissão da doença, a normalização dos valores é observada (Cartum *et al.*, 2004).

Outros parâmetros laboratoriais, como os níveis de enolase neuroespecífica e a relação entre metabólitos das catecolaminas na urina, podem ser considerados como auxiliares na definição do prognóstico do NB. Quando >1, a relação entre a excreção dos metabólitos de catecolaminas associa-se a maior

sobrevida. E níveis mais elevados NSE (enolase neuro específica) são encontrados em crianças com doença avançada, correlacionando-se com um prognóstico desfavorável (Cartum *et al.*, 2004).

2.1.2 Retinoblastoma

O retinoblastoma (RB) consiste de um tumor intraocular de origem embrionária da retina, provenientes de retinoblastos primitivos, que são células imaturas da retina (Othman *et al.*, 2012). É a malignidade intraocular primária mais comum na infância, com uma incidência de aproximadamente um em cada 15.000-20.000 nascimentos no mundo. Acomete em geral crianças menores de cinco anos de idade, entretanto cerca de 80% das crianças com RB são diagnosticadas antes dos três anos de idade. O diagnóstico de RB em crianças com seis anos ou mais é raro (Rodrigues *et al.*, 2004; Chintagumpala *et al.*, 2007; Lukusa *et al.*, 2012; Houston *et al.*, 2013).

O RB corresponde à cerca de 3% das neoplasias malignas infantis nos países desenvolvidos, entretanto há evidências de prevalências superiores nos países em desenvolvimento da América Latina, África e Índia, ocorrendo principalmente por causa de doença avançada, decorrente da determinação tardia de diagnóstico e consequente pior prognóstico da doença. O sucesso do tratamento do RB depende da habilidade dos pais e do pediatra em detectar precocemente a doença, quando ainda possui apresentação intraocular (Rodrigues *et al.*, 2004; Lukusa *et al.*, 2012; Houston *et al.*, 2013).

Os sinais e sintomas do RB dependem do seu tamanho e localização, sendo mais comumente encontrado a leucocoria, também chamada de reflexo do "olho do gato", que se caracteriza por um reflexo branco na pupila. Outras

manifestações incluem estrabismo, hiperemia conjuntival, cegueira e glaucoma. Quando a doença apresenta disseminação extraocular, observa-se frequentemente massa orbitária com proptose (Figura 2). Quando há metástase para o sistema nervoso central, pode apresentar cefaléia, vômitos, anorexia e irritabilidade. A disseminação extraocular e metástase são indicativas de pior prognóstico, sendo a dor óssea a principal manifestação clínica em casos de disseminação para os ossos ou medula óssea (Rodrigues *et al.*, 2004; Balmer *et al.*, 2006).

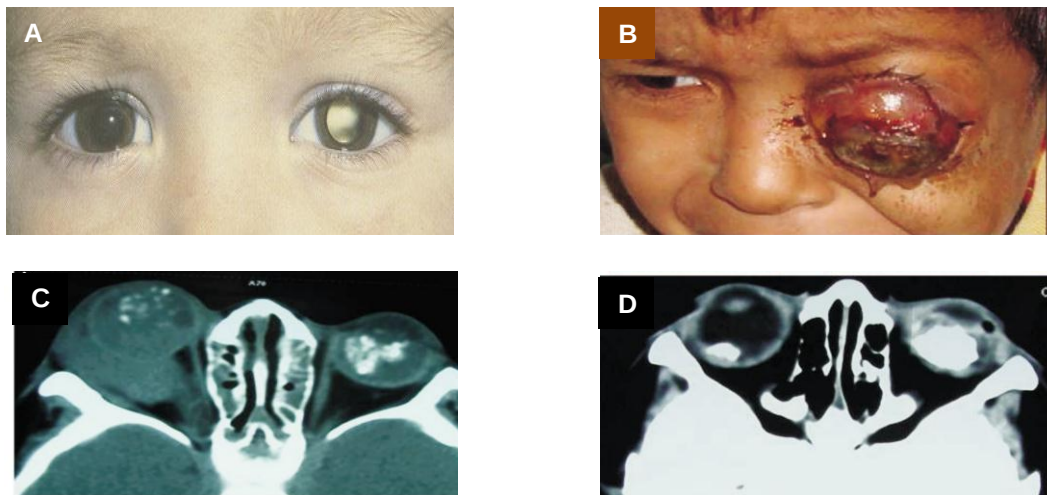


Figura 2: Manifestações clínicas em criança com retinoblastoma. **A.** Leucocoria; **B.** Criança com cinco anos de idade apresentando severa proptose do olho esquerdo. A leucocoria foi percebida desde os 18 meses, mas não foi considerada importante pelos seus pais; **C.** Massa intraocular com focos de calcificação, perfuração posterior do globo, causando proptose com extensão de nervo óptico. Massa no olho esquerdo com densa calcificação sem extensão extraoculares; **D.** Tumor bilateral pós quimioterapia, mostrando massa calcificada em ambos os globos, sendo maior no lado esquerdo. (Bertoldi *et al.*, 2012; Sethi *et al.*, 2013)

Essa malignidade pode ocorrer de forma hereditária ou esporádica. Cerca de 60% dos casos apresentam-se na forma de RB esporádico, os quais são susceptíveis ao desenvolvimento da doença através de duas mutações somáticas do *gene retinoblastoma 1 (RB1)*. Esses pacientes têm doença comumente

unilateral, unifocal e de início tardio, surgindo após o primeiro ano de vida. Aproximadamente 40% dos pacientes apresentam a forma hereditária, geralmente bilateral, com transmissão autossômica dominante de alta penetrância (90%), início precoce e múltiplos tumores, decorrente de mutação germinativa do gene *RB1*, sendo necessária uma segunda mutação para o desenvolvimento do tumor (Mohammed *et al.*, 2009). Apenas cerca de 2% dos casos herdados apresentam-se unilateralmente (Little *et al.*, 2011).

Segundo Knudson (1978), o retinoblastoma é um exemplo clássico de predisposição genética ao câncer, sendo substrato clínico para a hipótese dos “dois eventos”. O modelo de Knudson postula que seriam necessários dois eventos para o desenvolvimento da neoplasia. Indivíduos normais apresentariam duas cópias funcionais do gene *RB*. Os casos familiares seriam heterozigotos para gene *RB*, ou seja, uma perda alélica ou inativação gênica germinativa ocorreria como “primeiro evento”, assim um único gene funcional impediria a transformação maligna, sendo necessário um “segundo evento”, adquirido como um evento somático, que levaria à perda ou inativação do segundo alelo e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da malignidade. As neoplasias esporádicas resultam da inativação sequencial de ambos os alelos em uma única célula da retina em paciente cujo genótipo é normal, ou seja, duas mutações somáticas são requeridas para o desenvolvimento da malignidade, explicando o início tardio e a unilateralidade da doença (Knudson, 1978; Othman *et al.*, 2012).

O gene *RB1* é um componente crucial no controle do ciclo celular. O gene *RB1*, localizado no cromossomo 13q14, é um importante supressor de tumor, cujo produto, a proteína pRB, possui funções em várias vias biológicas como regulador do ciclo celular, modulando o mecanismo de fosforilação durante a proliferação e

diferenciação da célula (Figura 3). A inativação do gene *RB1*, através da deleção ou inativação do gene, pode ser um evento-chave no desenvolvimento do tumor, contribuindo para a perda do controle do ciclo celular, iniciação e progressão tumoral (Jacob *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012).

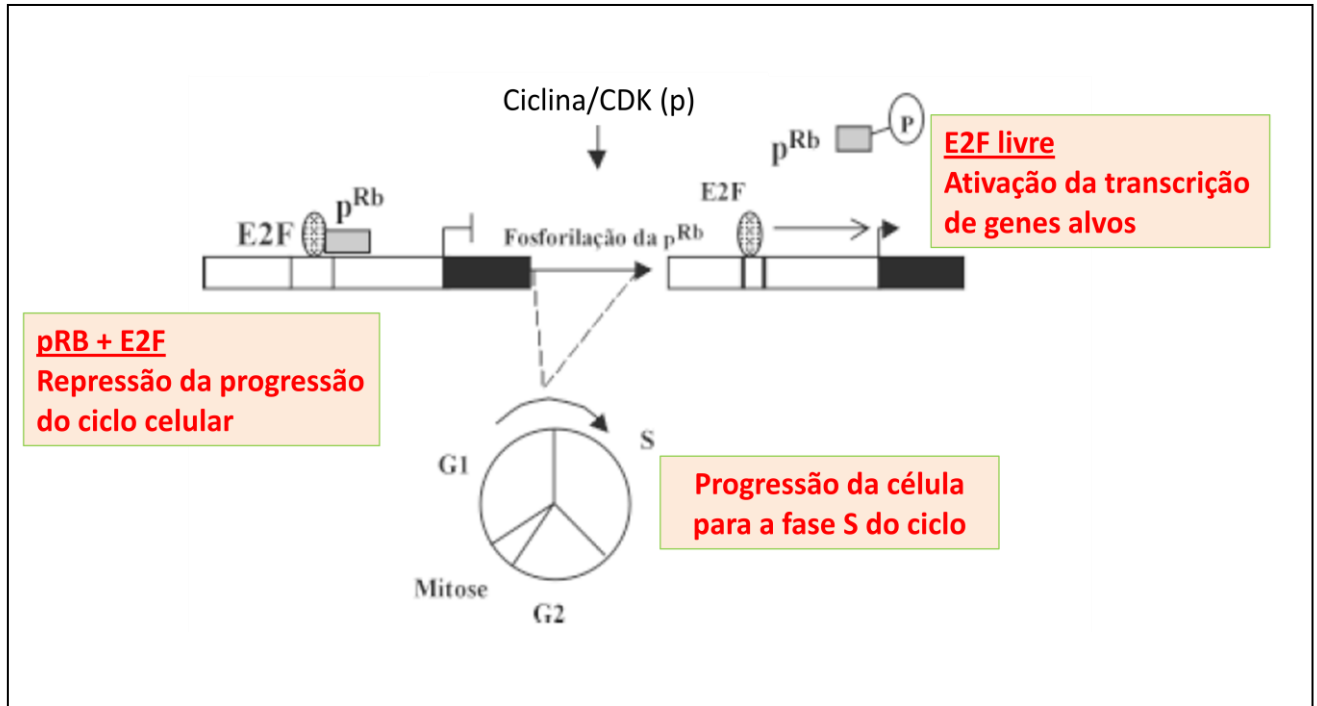


Figura 3: Regulação do ciclo celular pela proteína retinoblastoma (pRB). pRB é fosforilada pela ciclina/CDK com liberação do fator de transcrição E2F, normalmente ligado a pRB, ativando a expressão de genes envolvidos na síntese de DNA. Mutações envolvendo o gene *RB1* levam ao aumento da proliferação celular, que pode ser um dos primeiros passos para transformação maligna dessas células (Klumb, 2001).

Embora associações entre o RB e mutações ou silenciamento do gene supressor tumoral *RB1* venha sendo proposta desde 1978 por Knudson, evidências diretas e indiretas provenientes de estudos clínicos, epidemiológicos e familiares demonstram que más condições sócio-econômicas e culturais, bem como fatores ambientais adversos em que vivem os pais de crianças com RB, também podem ser importantes no desenvolvimento tumoral (Donaldson *et al.*,

1997). A deficiência de micronutrientes, como o folato, vitaminas B6 e B12; e infecções virais, principalmente pelo HPV (*Human papillomavirus*), EBV (*Epstein-Barr virus*), e HIV (*Human papillomavirus*), podem assumir papéis importantes como agentes predisponentes à perda de estabilidade e integridade genômica, razão pela qual têm sido associados a vários tipos de câncer (Klumb, 2001). Entretanto, muitos dados acerca do valor clínico das alterações genéticas associadas a fatores sócio-econômicos, culturais e ambientais de importância epidemiológica, na expressão de doenças multifatoriais, como o RB, são controversos.

Yang *et al.* (2008) analisaram variáveis como idade ao diagnóstico, lateralidade, modalidades de tratamento, início tardio do tratamento e invasão do nervo óptico, visando elucidar fatores prognósticos associados às taxas de sobrevida de pacientes com RB em tratamento primário ao longo de 20 anos. Os resultados indicaram que a extensão da doença ao diagnóstico, ou seja, a invasão do tumor pelo nervo óptico, sistema nervoso central (SNC) ou metástases à distância, é o fator prognóstico mais significativo para a sobrevivência dos pacientes com RB, tornando bastante pequenas as chances de sobrevida desses pacientes. Os casos com doença intraocular apresentam um excelente prognóstico, com sobrevida variando em torno de 80 a 90%. Em contrapartida, os casos com doença extraocular tem exibido uma taxa de sobrevida de 10 a 30% (Bertoldi *et al.*, 2012).

Adicionalmente, foi observado que o início tardio do tratamento aumenta o risco de invasão do nervo óptico. Lukusa *et al.* (2012) relatam uma taxa de sobrevivência de 95% em crianças com RB em países desenvolvidos, entretanto, em países em desenvolvimento as curas refletem menos de 50%, principalmente

devido ao avanço da doença e diagnóstico tardio. Assim, a conscientização parental quanto ao risco de suas consequências e a importância do tratamento precoce é vital para alcançar a melhoria das taxas de sobrevivência (Yun *et al.*, 2011).

Sistemas de estadiamento clínico patológico estão disponíveis na literatura para classificar o RB. A classificação proposta por Reese-Ellsworth (1976) é a mais utilizada em casos de RB intraocular. Para classificação extraocular tem sido utilizado por muitos pesquisadores o estadiamento CCSG (*Children Cancer Study Group*), complementando assim, a classificação Reese-Ellsworth. Assim, o RB diferia de outras neoplasias pediátricas por não apresentar um sistema de classificação amplamente aceito que abrangesse todo o espectro da doença (Bertoldi *et al.*, 2012; Othman *et al.*, 2012).

Para adotar um sistema uniforme de estadiamento, um comitê de especialistas em RB dos grandes centros em todo o mundo desenvolveu uma classificação de consenso, a Classificação Internacional para Retinoblastoma, publicada por Chantada *et al.* (2006) . Os pacientes são classificados de acordo com critérios clínico patológicos, como o grau de ressecção tumoral e a extensão da doença. O sistema de classificação desenvolvido é exibido na Tabela 3 (Chantada *et al.*, 2006), sendo aceito e usado em grupos de oncologia pediátrica (Khetan *et al.*, 2011).

O diagnóstico do RB é feito através do exame oftalmológicos e de imagens. O exame de ultrassom fornece informação sobre o tamanho da lesão e avalia a presença de calcificação intra-lesional, sinal bastante característico do RB. A ressonância magnética é importante para avaliação do comprometimento extraocular e invasão do nervo óptico, além de ser útil no diagnóstico diferencial

entre RB e outras doenças oculares. A tomografia computadorizada é o melhor exame de imagem para detectar o cálcio intra-tumoral; apesar disso, deve-se evitar a sua utilização de rotina, pois a exposição do paciente à radiação aumenta o risco de segunda neoplasia, principalmente nos pacientes com RB hereditário (Bertoldi *et al.*, 2012).

Tabela 3: Classificação Internacional do Retinoblastoma.

Estadio	Definição
0	Pacientes tratados conservadamente (sujeito à classificação oftalmológica pré-operatória).
I	Olho enucleado, completamente ressecado histologicamente.
II	Olho enucleado, com tumor residual microscópico.
III	Extensão Regional: (a) doença orbital evidente; (b) extensão a linfonodo cervical ou pré auricular.
IV	Doença metastática: (a) Metastática hematogênica: (1) Lesão única, (2) Múltiplas lesões; (b) Extensão SNC*: (1) Lesão prequiasmática, (2) Massa no SNC*, (3) Doença leptomenigeal.

Fonte: Chantada *et al.*, 2006; Aerts *et al.*, 2006

*SNC: Sistema Nervoso Central

Procedimentos invasivos, como a biopsia, são raramente indicados em casos de suspeita de RB, devido ao risco aumentado de disseminação extraocular do tumor que o procedimento carrega, o que iria converter uma doença intraocular curável em uma doença metastática extraocular com um

prognóstico extremamente pobre. Portanto, na ausência de um diagnóstico do tecido, condições benignas que podem mimetizar o RB, como outras causas de leucocoria, devem ser cuidadosamente excluídas através de um diagnóstico diferencial. Estas condições incluem: a retinite exudativa de Coat, fibroplasia retrolental, granuloma larval (*Toxocara canis*), persistência hiperplásica do vítreo primário, hemorragias, infiltração da retina por metástases e estágios avançados de angiomatose de retina, que podem ser diferenciadas do RB por um oftalmologista especialista em Oncologia Ocular (Chintagumpala *et al.*, 2007; Bertoldi *et al.*, 2012).

O diagnóstico do RB nos países em desenvolvimento é mais tardio quando comparado aos desenvolvidos. O período entre o aparecimento, por exemplo, do estrabismo até o diagnóstico confirmado de RB, nos países desenvolvidos, é de dois meses, enquanto que nos países em desenvolvimento é de 8,8 meses (Bertoldi *et al.*, 2012). O diagnóstico precoce do RB é importante para preservação da visão e para sobrevivência do paciente. Quanto maior é o atraso do diagnóstico, mais avançada é a doença, menores são as chances de cura, maiores as sequelas do tratamento agressivo e pior o prognóstico. O sucesso do tratamento do retinoblastoma está associado aos cuidados e atenção dos pais e do pediatra em perceber a presença da doença quando ela ainda está em estágio inicial, encaminhando assim para tratamento adequado (Rodrigues *et al.*, 2004).

O tratamento do RB objetiva não somente a cura da doença, como também a preservação da vida da criança e conservação da visão, visando minimizar quaisquer complicações ou efeitos colaterais do tratamento. Para isso, muitas abordagens terapêuticas estão disponíveis e as indicações para uma

modalidade específica ou uma combinação dessas modalidades variam de acordo com cada paciente, dependendo do estadiamento, lateralidade, status, potencial metastático e risco de segundo câncer. O tratamento normalmente é prolongado durante muitos meses e requer repetidas visitas de gerenciamento ativo e acompanhamento (Chintagumpala *et al.*, 2007; Meel *et al.*, 2012; Othman *et al.*, 2012; Houston *et al.*, 2013).

Em geral, a principal modalidade de tratamento para o RB intraocular baseia-se em quimiorredução seguida de tratamento de consolidação. A maioria dos pacientes com RB unilateral e doença intraocular avançada geralmente passam por enucleação, que resulta em uma taxa de cura de 95%. Crianças com envolvimento de ambos os olhos no diagnóstico geralmente requerem multimodalidade terapêutica (quimioterapia e terapias locais), mesmo se um olho está abrigando uma doença avançada, a enucleação é adiada até o final do tratamento quimioterápico. A quimioterapia tem um efeito variável no RB com invasão extraocular, 25% dos olhos enucleados após receber quimioterapia não apresentam tecido tumoral residual viável. Entretanto, células tumorais viáveis permanecem na maior parte dos olhos enucleados após quimioterapia. Sendo assim, é muito importante conscientizar os pais da possível necessidade da enucleação após conclusão de tratamento sistêmico. Contudo, maiores esforços precisam ser direcionados para o reconhecimento precoce do tumor, a fim de melhorar a sobrevivência de pacientes com RB em países em desenvolvimento (Chintagumpala *et al.*, 2007; Meel *et al.*, 2012; Othman *et al.*, 2012; Houston *et al.*, 2013; Sethi *et al.*, 2013).

Com o advento de terapias mais eficazes contra o câncer, há um número crescente de sobreviventes tratados para o câncer infantil. Entretanto, neoplasias

malignas secundárias subsequentes estão sendo cada vez mais reconhecidas, como sequelas finais da terapia. Subconjuntos de pacientes expostos à terapia com radiação ou de agentes quimioterápicos específicos e pacientes com predisposição genética conhecida para malignidade foram mostrados por apresentar um risco maior para a ocorrência de neoplasias malignas secundárias subsequentes e, portanto, um considerável interesse tem sido dedicado a essas neoplasias (Neglia *et al.*, 2001).

Yang *et al.* (2008) observaram que sobreviventes do RB hereditário como tumor primário, apresentavam um risco elevado de desenvolver uma segunda malignidade. Uma criança com RB tem aproximadamente 5% de chance de desenvolver outra malignidade durante os primeiros 10 anos de seguimento, 18% durante os primeiros 20 anos, e mais de 44% aos 45 anos. A incidência acumulativa de 30 anos é de aproximadamente 35%, até mesmo para aqueles pacientes que receberam terapia com radiação. Sarcoma osteogênico, frequentemente envolvendo o fêmur, é o mais comum, mas outros tumores como o sarcoma de células, condrossarcoma, rabdomiossarcoma, neuroblastoma, glioma, leucemia, carcinoma de células sebáceas, carcinoma de células escamosas e melanoma maligno e câncer de cérebro também podem ser malignidades secundárias ao tratamento para RB. O risco de câncer em sobreviventes de retinoblastoma hereditário podem ser minimizados através da limitação da exposição do DNA a agentes nocivos, como a radioterapia, tabaco e luz ultra violeta (Othman *et al.*, 2012).

Contudo, a determinação da cura e a preservação da visão do portador de RB estão diretamente associadas ao diagnóstico precoce, podendo ser iniciado pela observação dos próprios pais da criança com a patologia. Quanto mais

precoce o diagnóstico, menor a extensão da doença, maior as taxas de cura e há uma redução importante das sequelas e efeitos colaterais decorrentes da terapêutica. Campanhas para a população leiga e treinamento dos profissionais da saúde são de fundamental importância para divulgar os sintomas iniciais do RB (Bertoldi *et al.*, 2012).

2.1.3 Tumor de Wilms

Tumor de Wilms (TW), também chamado de Nefroblastoma, é a neoplasia embrionária originada de células do blastema metanéfrico primitivo formador do rim no embrião. Portanto, os tumores se assemelham aos tecidos do desenvolvimento embrionário e refletem estágios da nefrogênese normal, fornecendo informações importantes sobre desenvolvimento renal normal e anormal (Gadd *et al.*, 2012).

O TW é a neoplasia maligna renal mais comum na população pediátrica, afetando uma em 10.000 crianças, e responde por 6 a 7% dos tumores malignos da infância. Ocorre mais comumente em menores de 5 anos, em cerca de 75% dos casos, com média de 3,5 anos de idade e com incidência baixa após os 10 anos de idade, e distribuição semelhante entre os sexos (Hui *et al.*, 2012).

A maioria dos casos de TW é esporádica, entretanto, aproximadamente 1 a 2% dos pacientes apresentam a forma hereditária da doença, cerca de 5% destes têm tumores bilaterais, afetando ambos os rins, e 7% têm doença multicêntrica. O TW pode originar-se no córtex ou medula renal, podendo invadir os cálices, ureter e, em 6% dos casos, o tumor se estende para a veia renal e veia cava inferior (Figura 4). A taxa de metástase do TW é relativamente alta,

sendo representada por 5%, e comumente dissemina-se para pulmões, linfonodos e fígado, raramente levam a metástases nos ossos, medula óssea ou cérebro. (Kaste *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2012).

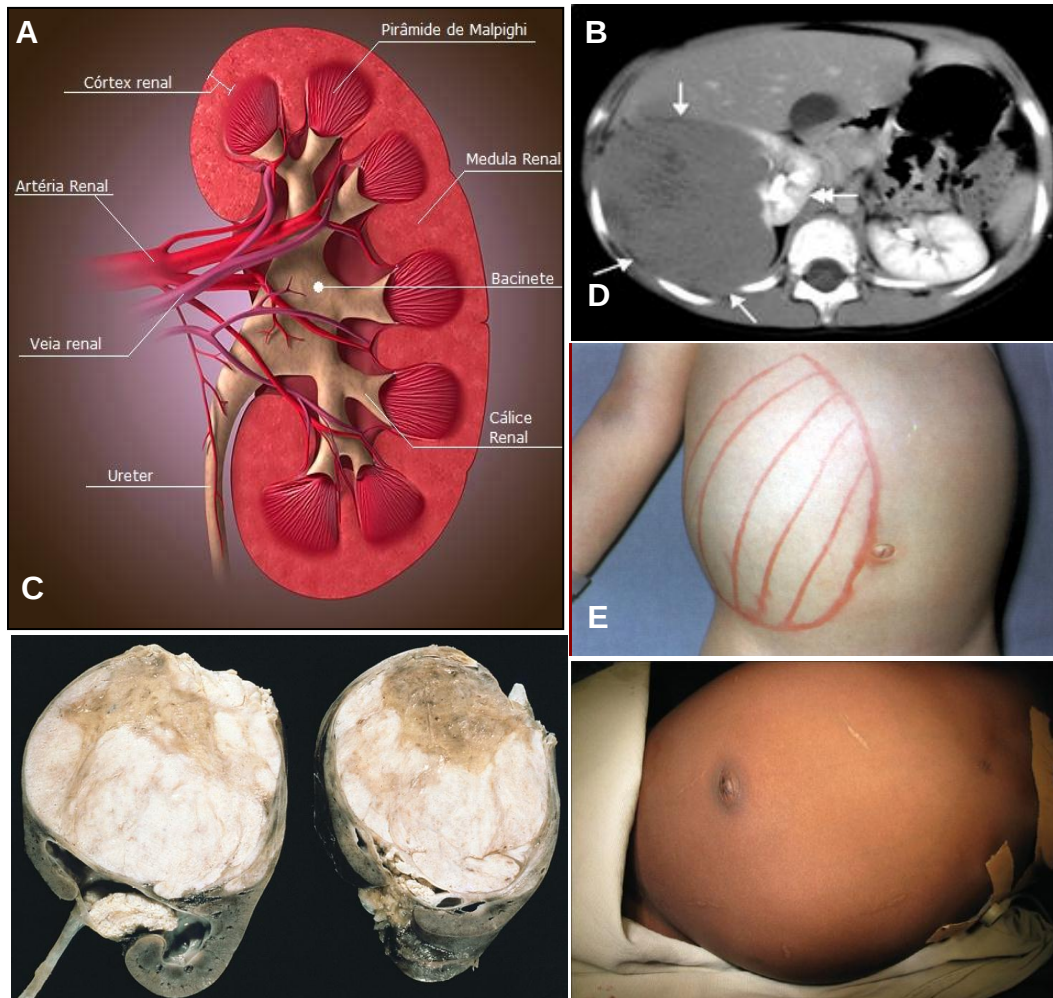


Figura 4: Apresentação clínica em TW. **A.** Estrutura do rim, destacando regiões como o córtex e medula adrenal, cálices, artérias e veias renais e ureter (<http://www.infoescola.com/biologia/sistema-excretor-nos-vertebrados/>). **B.** Tomografia computadorizada do tumor de Wilms do rim direito, o qual desloca o rim e o fígado medialmente (Kim and Chung, 2006). **C:** Corte mostrando duas metades de rim com Nefroblastoma (http://en.wikipedia.org/wiki/Wilms'_tumor). **D.** Tumor de Wilms em paciente, presente como massa abdominal (<http://courses.md.huji.ac.il/96854e/abdominalmass/slide33.htm>). **E.** Abdômen de uma criança com tumor de Wilms (Tan and Mteta, 2011).

O TW hereditário parece estar associado à ocorrência de síndromes e malformações congênitas de desenvolvimento do trato geniturinário. As três síndromes de malformações congênitas mais frequentemente associadas ao TW

são a síndrome de Denys-Drash, caracterizada por pseudo-hermafroditismo e nefropatia; a síndrome de Beckwith-Wiedemann, caracterizada por hemi hipertrofia, onfalocele, visceromegalia e predisposição a múltiplos tipos de tumores; e a síndrome de WAGR, caracterizada por TW, anidria, malformações geniturinárias e retardo mental (Ferrara *et al.*, 2009).

Essa associação observada entre síndromes e o desenvolvimento de TW auxiliou na identificação dos genes envolvidos na patogênese da doença. Em 1972, Knudson e Strong propuseram um mecanismo genético modelo para o desenvolvimento do TW, baseado no modelo proposto para o desenvolvimento do retinoblastoma.

Entretanto, a existência de loci adicionais com função na iniciação do desenvolvimento tumoral foi indicada. Estas observações sugeriram que a genética da TW era mais complexa do que originalmente proposto por Knudson e Strong (1972), fornecendo um modelo para a tumorigênese com múltiplos eventos, mais amplamente aplicável que o modelo de Knudson. Várias regiões cromossômicas, incluindo 1p, 11p13, 11p15 e 16q mostram alterações genéticas consistentes no tecido tumoral, sugerindo que múltiplos genes supressores estão provavelmente envolvidos na etiologia da doença (Karnik *et al.*, 1998). Os loci em 7p, 17p (gene supressor de tumor *TP53*), 17q (gene do tumor Wilms de predisposição familiar *FWT1*) e 19q (gene do tumor Wilms de predisposição familiar *FWT2*) também parecem estar envolvidos na biologia do tumor de Wilms, mas ainda não são bem conhecidos (Coppes *et al.*, 1999; Gadd *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, extensas pesquisas tem apontado o envolvimento de cinco genes no desenvolvimento do TW, entre eles o *WT1*, *CTNNB1*, *WTX*, *TP53* e anormalidades epigenéticas em 11p15, no locus *H19/IGF2* (Koesters *et al.*,

1999; Gadd *et al.*, 2012; Hui *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2012) . Entretanto, dois loci genéticos têm sido fortemente relacionados ao TW, os genes *WT1* e *WT2*, localizados em 11p13 e 11p15.4, respectivamente. Aproximadamente 5% das crianças têm mutações constitucionais subjacentes ao gene *WT1* ou defeitos epigenéticos, que predis põem ao desenvolvimento do tumor de Wilms. Um terceiro locus, o *WT3*, parece estar envolvido em formas familiares raras, mas ainda não foi mapeado (Austruy *et al.*, 1993; Perlman *et al.*, 2011; Gadd *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2012).

O gene supressor de tumor *WT1* possui ~50 kbp, sendo constituído por 10 exons, dois dos quais resultam em quatro mRNA. Esse gene codifica a proteína WT1, um fator de transcrição regulador da expressão de gene, expresso em tecido renal normal, importante em várias fases do desenvolvimento gonadal, renal e cardíaco normal, em processos de diferenciação celular. Mutações germinativas no *WT1* foram documentadas em crianças com síndromes, como WAGR e Denys-Drash, ambas caracterizadas pelo aumento do risco de desenvolver TW e anomalias do desenvolvimento urogenital (Coppes *et al.*, 1993; Varanasi *et al.*, 1994).

O gene *WT2*, localizado na região cromossômica 11p15 com cerca de 10Mb, tem se mostrado uma área intrigante do genoma humano. Ensaio s funcionais em células de tumor de Wilms e rabdomiossarcoma suportam a existência de um gene supressor de tumor nessa região. Além disso, vários estudos têm associado alterações na região 11p15, como dissomia uniparental ou duplicações, a transtornos relacionados ao crescimento, tais como a síndrome de Beckwith-Wiedemann, que carregam um maior risco de TW e anormalidades do desenvolvimento. Adicionalmente, uma variedade de cânceres humanos,

incluindo o desenvolvimento de TW, vem sendo relacionada a uma alta frequência de perda de heterozigosidade ou perda de *imprinting* da região 11p15, observada em grande proporção em TW esporádicos (Reis *et al.*, 1996; Crider-Miller *et al.*, 1997; Karnik *et al.*, 1998; Gadd *et al.*, 2012).

A apresentação clínica inicial mais comum de TW consiste em estado geral bom, com presença de massa abdominal assintomática observada acidentalmente por um familiar ou em pesquisas de rotina pelo pediatra. No entanto, dor e crescimento abdominal também podem ser observados (Figura 4). Outros sinais e sintomas frequentes incluem: mal-estar, anorexia, febre e hematúria que, em cerca de 25% dos casos, é macroscópica, tendo apresentação clínica dependente da extensão do sangramento. Até 50% das crianças com TW apresentam hipertensão em alguma fase de sua evolução, podendo ser causada pela isquemia renal decorrente da pressão do tumor diretamente sobre a artéria renal. A varicocele pode ser observada, assim como a anidria, hemi-hipertrofia e anormalidades genito urinárias, como criptorquidia e hipospádia (Prasil *et al.*, 2000; Grundy *et al.*, 2002; Pritchard *et al.*, 2002; Koshinaga *et al.*, 2013).

O diagnóstico de TW e a avaliação da extensão da doença são realizados com base na análise clínica do paciente, através do uso de exames de imagem (como tomografia computadorizada, ultrassonografia, ressonância magnética e raio X) e biópsia para confirmação histológica, quando indicados. Os exames de imagem fornecem uma visão panorâmica do abdômen e avaliação de suas estruturas e linfonodos, assim como permitem definir a natureza da massa tumoral, estabelecer a sua origem e identificar a presença de lesões metastáticas. (Odone Filho *et al.*, 1983; Dome e Huff, 2003).

O TW vem se destacando como um dos sucessos da oncologia pediátrica, com uma taxa global de cura de mais de 85%, usando terapias relativamente simples. Este excelente resultado tem sido a consequência de esforços em colaboração entre cirurgiões, pediatras, patologistas e oncologistas, representando um exemplo real de como o esforço combinado de várias instituições, utilizando protocolos uniformes, contribuiu para a melhora dos resultados terapêuticos. Os dois maiores grupos cooperativos que têm estudado o melhor tratamento para o TW são a *International Society of Pediatric Oncology* (SIOP), na Europa, e a *National Wilms' Tumor Study* (NWTS), nos Estados Unidos, que realizaram vários ensaios multicêntricos, contribuindo para uma definição base para o atual tratamento do tumor (Tournade *et al.*, 2001; Spreafico *et al.*, 2006).

A abordagem multidisciplinar combina cirurgia e quimioterapia, associados à radioterapia, quando necessário. A ressecção cirúrgica do tumor e do rim envolvido é a recomendação de tratamento inicial nos Estados Unidos e no Japão, seguida de quimioterapia e radioterapia consecutivas, administradas após estadiamento cirúrgico e diagnóstico histopatológico definitivo. Em contrapartida, a principal contribuição do grupo Europeu concentra-se no uso de tratamento quimioterápico prévio à cirurgia. Contudo, a decisão terapêutica baseia-se em fatores prognósticos considerados importantes, que definem grupos de risco, tornando o tratamento mais eficaz e minimizando a frequência e a intensidade das complicações, bem como o custo da terapia (Pietras *et al.*, 2012; Koshinaga *et al.*, 2013).

Entre os diferentes fatores prognósticos, o estadiamento clínico e o tipo histológico do tumor são os parâmetros mais importantes na avaliação do

prognóstico e a sobrevida de pacientes com TW. Outros fatores apresentam significância prognóstica, mas seus papéis ainda não estão bem estabelecidos, são eles: idade, extensa diferenciação tubular, diferenciação de músculo esquelético, produção de mucina, variações no nível de ploidia de ácido desoxirribonucleico (DNA) e perda de heterozigosidade em 1p e 16q, mutação de TP53, marcadores de proliferação (MIB-I ou Ki67), antígeno nuclear de proliferação celular, expressão da proteína p27, receptor do fator de crescimento endotelial vascular, plaquetas derivadas do receptor do fator de crescimento e expressão do receptor de fator de crescimento de insulina tipo I (Das *et al.*, 2012; Basta-Jovanovic *et al.*, 2012; Segers *et al.*, 2013).

Os tipos histológicos favoráveis e desfavoráveis têm um grande impacto sobre o prognóstico. O prognóstico é relativamente bom para a maioria dos casos de Nefroblastoma com uma histologia favorável (Kaste *et al.*, 2008; Koshinaga *et al.*, 2013). Adicionalmente, a determinação do estadiamento da doença baseia-se na avaliação da extensão do tumor, de acordo com achados cirúrgicos e patológicos (Green, 2004; Williams *et al.*, 2004).

De acordo com o protocolo de estadiamento do SIOP, o estadio da doença é determinado através da ressecção tumoral e confirmação histológica, após um período inicial de quimioterapia pré operatória, que reflete mudanças induzidas pelo uso de quimioterápicos e inclui alterações regressivas ou de diferenciação celular (Vujanic *et al.*, 2002; Vujanic *et al.*, 2010). O estadiamento do TW conforme a SIOP está descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Estadiamento do Tumor de Wilms segundo SIOP.

Estadio	Definição
I	Tumor limitado ao rim e completamente ressecável: - O tumor limitado ao rim ou cercado com uma pseudocápsula fibrosa, fora os contornos normais do rim. A cápsula renal ou pseudocápsula pode ser infiltrada pelo tumor, desde que a sua superfície externa não seja comprometida. - Protusão do tumor para o sistema pélvico e ureter, sem infiltração. - Ausência de invasão dos vasos ou dos tecidos moles do seio renal. - Os vasos intrarenais podem estar invadidos.
II	- Tumor se estende além do rim e/ou penetra na cápsula renal ou pseudocápsula fibrosa até a gordura perirenal, porém é completamente ressecável. - Infiltração dos tecidos moles do seio renal ou dos vasos sanguíneos e linfáticos ou em tecidos perirenais, mas completamente ressecável. - Invasão dos órgãos adjacentes ou veia cava, porém ressecável.
III	Excisão incompleta do tumor. - Presença de linfonodos abdominais envolvidos. - Ruptura do tumor antes ou durante procedimento cirúrgico. - Presença de tumor na superfície peritoneal. - Trombo tumoral nas margens da ressecção de vasos do ureter. - Biópsia prévia
IV	Metástases hematogênicas (pulmões, fígado, ossos, cérebro, etc) ou metástases para linfonodos fora da região abdominal.
V	Tumor de Wilms bilateral ao diagnóstico

Fonte: Vujanic *et al.*, 2010

2.1.4 Meduloblastoma

O Meduloblastoma (MB) é um tumor embrionário neuroepitelial maligno do sistema nervoso central (SNC), com localização preferencial na linha média da fossa posterior, sendo 94,4% dos casos envolvendo o cerebelo e destes, mais de 75% originam-se no vérmis cerebelar, surgindo a partir de precursores neuronais imaturos do cerebelo, comprimindo ou estendendo-se do quarto ventrículo (Figura 5) (Sarkar *et al.*, 2006; Belcher, 2009; Santa Anna *et al.*, 2009; Huse *et al.*, 2010).

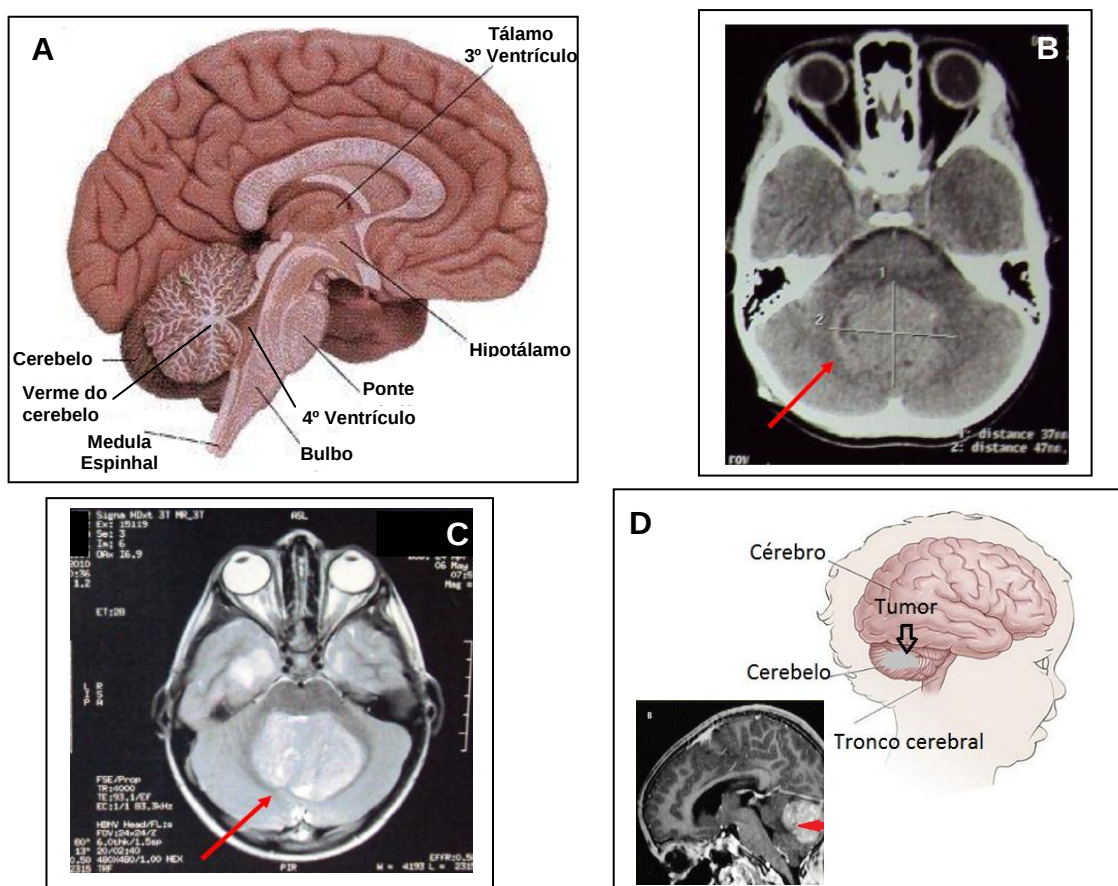


Figura 5: A localização do meduloblastoma. **A.** Estrutura do cérebro destacando regiões como o cerebelo, 3 e 4º ventrículos, hipotálamo, ponte, bulbo e medula espinhal. **B.** Tomografia computadorizada evidenciando MB localizado na fossa posterior. **C:** MB evidenciado por Ressonância Magnética. **D.** Figura esquemática da localização do MB no cerebelo de uma criança (Kumar *et al.*, 2001; Crawford *et al.*, 2007; Da Fonte *et al.*, 2008).

O MB é o tumor do SNC mais comum em pediatria, sendo responsável por 12 a 25% dos tumores intracranianos e 40% de todos os tumores da fossa posterior na infância. Os tumores do SNC representam a segunda neoplasia mais frequente em crianças, o que corresponde de 17 a 25% dos tumores pediátricos, excedidos apenas pelas leucemias (Cervoni, 1994; Rodrigues and Camargo, 2003; Neves, 2006; Nordfors *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011; Sümer-Turanligil *et al.*, 2013).

O MB trata-se de um tumor cerebelar maligno altamente invasivo e de crescimento rápido, o qual pode disseminar-se através do líquido cefalorraquidiano (LCR) (Yachnis, 1997; Da Fonte *et al.*, 2008). É responsável por quase 10% das mortes por câncer em crianças menores de 15 anos de idade, tendo, as neoplasias do SNC, uma maior probabilidade de levar à morte (45%) do que o conjunto de todas as leucemias (42%) e demais tumores sólidos (31%), representando a terceira causa de óbito nos Estados Unidos. Além de apresentarem importante causa de mortalidade, são responsáveis por morbidade superior aos demais tumores, em decorrência de suas sequelas causadas pela própria neoplasia, como também pelos tratamentos pelos quais a criança é submetida (Argollo e Lessa, 1999; Ferreira, 1999; Martins *et al.*, 2011).

Embora a maioria dos casos de MB aconteça na primeira década de vida, geralmente até os 8 anos de idade, seu maior pico de incidência ocorre entre 5 e 7 anos, sendo um terço dos casos diagnosticados antes dos 3 anos de idade. Possui rara ocorrência na população adulta, correspondendo a apenas 1% dos tumores nesta faixa etária. Além disso, é duas vezes mais comum no sexo masculino em relação ao sexo feminino (Cervoni, 1994; Albright *et al.*, 2008; Santa Anna *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2011).

Em função de sua localização na fossa posterior, o MB comporta-se como uma lesão expansiva, que causa compressão do quarto ventrículo, gerando sintomas como hidrocefalia obstrutiva e, conseqüentemente, típicas manifestações de hipertensão intracraniana, cefaleia, náuseas, vômitos e alterações variáveis do nível de consciência. O comprometimento cerebelar pode levar a problemas de equilíbrio e distúrbios graves na coordenação dos movimentos, com importante comprometimento da marcha, da estabilidade postural e dos atos motores complexos. Pode ocorrer paresia de nervos cranianos, gerando diplopia e estrabismo. Papiledema pode ser evidenciado como reflexo do quadro de hipertensão intracraniana (Raffel, 2004; Crawford *et al.*, 2007; Albright *et al.*, 2008; Santa Anna *et al.*, 2009).

Os exames de imagem (Figura 5) possuem papel indispensável no diagnóstico e planejamento terapêutico dos tumores intracranianos. Em geral, o primeiro exame a ser realizado é a Tomografia Computadorizada de Crânio, em função de sua acessibilidade e rapidez de realização. A ressonância magnética (RM), em particular, surgiu como uma modalidade de imagem frequentemente utilizada para a avaliação dos tumores intracranianos e continua a ter papel importante e crescente. A RM apresenta uma contribuição no diagnóstico do MB, evidenciando lesões heterogêneas da linha média. A utilização da RM também é essencial na investigação de doença extracraniana, sendo fundamental no estadiamento da doença. Outras modalidades de estudos neurorradiológicos apresentam utilização especialmente na diferenciação entre recorrência tumoral e a presença de radionecrose pós-tratamento. Contudo, deve ser considerado o diagnóstico diferencial de qualquer massa da fossa posterior em crianças ou em adultos jovens, pois radiologicamente, o MB pode apresentar ampla variedade de

formas, assumindo características que podem ser encontradas em outros tumores (Kumar *et al.*, 2001; Crawford *et al.*, 2007; Da Fonte *et al.*, 2008).

O tratamento do MB inclui três ferramentas principais e amplamente utilizadas: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Lee *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2011), sendo a cirurgia o principal tratamento e o de maior impacto na sobrevida de crianças com tumores do SNC. Mas, no que diz respeito à abordagem cirúrgica, sabe-se que o grau de ressecção é um fator importante, pois está intrinsecamente relacionado ao prognóstico e ao controle à longo prazo da doença (Albright *et al.*, 2008). Ressecções amplas e com mínimo resíduo tumoral, respondem melhor ao tratamento e apresentam menores taxas de recrescimento ou recidiva com o passar do tempo (Zeltzer *et al.*, 1999). Entretanto, as abordagens cirúrgicas têm considerável potencial de conferir uma maior morbidade ao paciente, devido à localização do tumor e o estabelecimento de relações com o 4º ventrículo e estruturas do tronco encefálico (Robertson *et al.*, 2008).

A radioterapia é fundamental no tratamento de crianças com MB, sendo a irradiação do neuroeixo importante na eliminação de possíveis lesões microscópicas. Porém, não é isenta de efeitos colaterais a curto e a longo prazo, sobretudo em relação à cognição e ao crescimento, na dependência da dose utilizada e da área coberta, principalmente em crianças menores de 3 anos, devido à imaturidade do cerebelo (Mulhern *et al.*, 1989). Em função da extrema morbidade da radioterapia nessas crianças menores de 3 anos de idade, esse tipo de tratamento não é rotineiramente realizado para essa faixa etária, sendo apenas indicada em crianças maiores de 3 anos (Lee *et al.*, 2003; Albright *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2011).

A quimioterapia é um tratamento padrão em pacientes de alto risco, especialmente nos menores de três anos de idade, permitindo a retirada completa da radioterapia em alguns casos, ou adiando o seu início, quando a tolerância do tecido nervoso às irradiações é maior. Além disso, a quimioterapia garante melhores resultados em pacientes submetidos à cirurgia e radioterapia, aumentando a sobrevida em 24 a 40% dos casos (Araújo *et al.*, 2011).

Graças aos avanços das técnicas de diagnóstico por imagem associadas a um tratamento adequado, baseado em ressecções cirúrgicas mais agressivas, irradiação do leito tumoral e do neuroeixo após a cirurgia, associadas ao advento da quimioterapia (QT), durante e após a radioterapia (RT); e à construção de unidades de terapia intensiva especializadas em pacientes pediátricos, o MB progrediu expressivamente em termos de sobrevida nos últimos anos, apresentando atualmente 60 a 70% de sobrevida livre da doença (Rondinelli *et al.*, 2004; Neves, 2006; Martins *et al.*, 2011). Em Fortaleza/Brasil, relatou-se uma discreta redução de 1,3 para 1,1 óbitos por 100.000 habitantes, quanto à taxa de óbitos por tumores cerebrais em menores de 15 anos entre os períodos de 1980 a 1982 e de 1995 a 1997 (Monteiro *et al.*, 2003).

Apesar do aumento das taxas de sobrevida para crianças com MB, pacientes constituintes do grupo considerado de alto risco, ou seja, aqueles que foram submetidos à ressecção parcial com massa residual maior que 1,5 cm, com idade inferior a 3 anos e com doença disseminada, essa taxa permanece muito reduzida, em cerca de 40%. Para crianças menores de dezoito meses as taxas são ainda piores, com sobrevida de apenas 22% livre de progressão por três anos (Ferreira, 1999; Rondinelli *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2011).

Dessa forma, as estratégias terapêuticas são baseadas em fatores clínicos prognósticos como idade ao diagnóstico, extensão da doença residual após cirurgia de ressecção do tumor e a presença ou ausência de disseminação da doença (Gilbertson *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2005).

Crianças mais jovens, principalmente as menores de 3 anos, costumam apresentar pior evolução da doença, menor sobrevida e, aquelas que sobrevivem, apresentam grave acometimento das habilidades cognitivas, quando comparadas às crianças maiores (Albright *et al.*; 1996, Gajjar *et al.*, 1997). A pior evolução da doença em pacientes mais jovens parece ocorrer devido ao fato de que essas crianças tendem a possuir mais doença metastática ao diagnóstico. No entanto, com novas abordagens terapêuticas, existe tendência à melhora do prognóstico para essa faixa etária (Evans *et al.*, 1996; Wisoff *et al.*, 1998).

Quanto à extensão cirúrgica, pacientes submetidos à ressecção completa apresentam maiores taxas de sobrevida em relação àqueles com ressecção parcial do tumor, que por sua vez apresentam maior impacto na mortalidade, sendo considerado um fator de mau prognóstico. Logo, o grau de extensão do tumor na abordagem cirúrgica inicial é considerado como importante fator prognóstico, visto que tumores de maior volume levariam a pior prognóstico pela impossibilidade de ressecção cirúrgica completa (Ferreira, 1999; Sandoval e Santiago, 2000; Rondinelli *et al.* 2004; Neves, 2006; Nascimento *et al.*, 2009).

No que diz respeito à disseminação da doença, a presença de células malignas em neuroeixo, no liquor, metástases hematogênicas ou a presença de disseminação da doença em outras localizações do SNC ao diagnóstico, estão associados a pior prognóstico (Rondinelli *et al.* 2004; Neves, 2006). Tumores de fossa posterior que infiltram o tronco encefálico apresentaram taxas de sobrevida

inferiores a daqueles que não o infiltram, pois a infiltração por contiguidade do tronco restringe a possibilidade de ressecção cirúrgica dos mesmos (Ferreira, 1999). Casos com doença disseminada, invasão do tronco cerebral ou portadores do tumor incompletamente ressecado têm sobrevida de 5 anos de 36% contra aproximadamente 50-60% de sobrevivência global observada em estudos de base populacional, para pacientes com melhor prognóstico (Korones, 2007).

Portanto, os fatores prognósticos de maior impacto na sobrevida das crianças portadoras de MB são a idade, o resíduo tumoral pós-operatório e fase metastática. Esses fatores são usados no diagnóstico e prognóstico do MB, podendo influenciar na escolha da terapia, sendo compatíveis com os critérios clínicos utilizados na classificação em grupos de baixo e alto risco. Entretanto, existem outros fatores de valor prognóstico que influenciam na sobrevida dos pacientes, mas não com tanta expressão, como por exemplo, a recidiva da doença em foco metastático; a não realização da radioterapia e da quimioterapia em pacientes de alto risco; tempo transcorrido entre os primeiros sinais e sintomas e o diagnóstico; subtipos histológicos do tumor; fatores biológicos e genéticos, além do estadiamento (Martins *et al.*, 2011).

Os resultados do tratamento do MB são diretamente dependentes do estadiamento clínico no diagnóstico inicial. O MB tem estadiamento próprio, proposto por Chang *et al.* (1969), aceito até o momento (Tabela 5).

O estadiamento permitiu que o MB fosse dividido em dois grupos de risco: alto e baixo risco. Os tumores considerados de alto risco são aqueles que acometem crianças menores de 3 anos, ou com ressecção incompleta, ou que apresentarem os critérios T3b, T4, M1 a M4 do estadiamento. A classificação em alto e baixo risco teve importância significativa na determinação da terapêutica

para esses pacientes. Os tumores de alto risco passam a receber tratamento quimioterápico em adição à cirurgia e radioterapia, enquanto que os de baixo risco são submetidos apenas aos tratamentos cirúrgico e radioterápico (Heidman *et al.*, 1997).

Tabela 5: Estadiamento para Meduloblastoma.

Estadio do Tumor (T)	
T1	Tumor menor que 3 cm de diâmetro, limitado à sua posição clássica envolvendo estruturas da fossa posterior, na linha média do vérmix, no teto do quarto ventrículo e menos freqüentemente nos hemisférios cerebelares.
T2	Tumor menor que 3 cm em diâmetro, invadindo estrutura adjacente na fossa posterior ou preenchendo parcialmente o quarto ventrículo
T3a	Tumor maior que 3 cm de diâmetro, invadindo duas estruturas adjacentes da fossa posterior ou preenchendo completamente o quarto ventrículo, com extensão ao aqueduto de Sílvius, forame Magendie ou forame Luschka produzindo hidrocefalia interna importante.
T3b	Tumor invadindo o assoalho do quarto ventrículo, originando-se no teto do 4º ventrículo ou tronco cerebral e preenchendo o quarto ventrículo.
T4	Tumor estendendo-se além do quarto ventrículo, disseminando-se através do aqueduto de Sílvius para o terceiro ventrículo ou mesencéfalo, ou tumor estendendo-se para medula cervical alta.
Estadio Metastático (M)	
M0	Sem evidências de disseminação tumoral, metástase subaracnoidéia ou hematogênica
M1	Presença de células tumorais no liquor
M2	Disseminação tumoral intracraniana, nódulos implantados no espaço subaracnoideo cerebelar, cerebral, ou no 3º ventrículo ou ventrículos laterais
M3	Disseminação tumoral intraespinal, nódulos implantados no subaracnoideo espinal
M4	Disseminação tumoral sistêmica, metástases fora do eixo crânio espinal

Fonte. Chang *et al.* 1969

2.2 Tumores sólidos embrionários e polimorfismos de genes envolvidos na rota metabólica do folato

Os tumores embrionários apresentam uma diversidade morfológica resultante das constantes transformações celulares, no entanto, pouco se conhece a respeito dos fatores de risco envolvidos na gênese desses tumores, bem como as possíveis causas e mecanismos etiopatogênicos.

Estudos realizados no Laboratório de Biologia Molecular (CEONHPE/HUOC/UPE) com leucemias pediátricas demonstraram interações entre leucemogênese e polimorfismos genéticos, como polimorfismos do gene *MTHFR* (Metilenotetrahidrofolato Redutase), associados ao risco de leucemias agudas. Esse mesmo grupo concluiu um estudo caso-controle inédito em retinoblastomas, encontrando uma associação dos polimorfismos A2756G do gene *MTR* (Metionina Sintase) e o aumento do risco para o desenvolvimento de retinoblastoma (de Lima *et al.*, 2010). Fazendo um paralelismo entre as leucemias e os tumores sólidos, é importante considerar que os dados epidemiológicos são semelhantes, tais como: idade precoce, peso ao nascimento, associações com anomalias congênitas e heterogeneidade morfológica (Pereira *et al.*, 2004; Zanrosso *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006). Esse fato propôs uma possível relação entre polimorfismos de genes envolvidos na rota metabólica do folato e os tumores sólidos.

A forma mais estável de folato, o ácido fólico é uma vitamina envolvida em complexas vias e processos bioquímicos essenciais para a vida. Possui papel fundamental como cofator para enzimas em processos de oxirredução e transferência de radical metila, implicadas na biossíntese de purinas, pirimidinas,

síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA), no metabolismo de aminoácidos, síntese protéica, processos de multiplicação celular, síntese de timidilatos e reações de metilação (Baluz *et al.*, 2002; Mezzomo *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007).

O ácido fólico é produzido por micro-organismos e vegetais superiores, contudo, mamíferos não possuem a capacidade de biossintetizá-lo. Portanto, a assimilação do folato a partir da dieta é essencial para os mamíferos, dada a sua importante função no metabolismo e indispensável função na mecânica celular. As principais fontes naturais do ácido fólico são os miúdos animais, vegetais folhosos verde-escuros (ex.: espinafre), brócolis, couve, aspargos, milho, amendoim, levedo, frutas cítricas e cereais integrais (Baluz *et al.*, 2002).

A ingestão inadequada de folato pode provocar a deficiência dessa vitamina no interior da célula. Essa deficiência tem sido associada ao desenvolvimento ou aumento de alguns tipos de câncer, principalmente do câncer colorretal e do câncer de mama, por serem tecidos de alta renovação e dependentes de suprimento de folato para a correta composição e duplicação do DNA (Franceschi *et al.*, 1998; Baluz *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2013).

Adicionalmente, foi observado que a presença de mutações em genes para enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo do ácido fólico também estão associadas à deficiência do folato intracelular, devido à redução da atividade enzimática e/ou aumento da termolabilidade das enzimas envolvidas, decorrentes da mutação. Dessa forma, o folato tem sido objeto de muitas pesquisas atuais. Em um estudo recente, foi identificado que uma em cada sete pessoas pode portar uma mutação genética que provoca uma deficiência de ácido

fólico, mesmo quando a alimentação contém a quantidade recomendada desse nutriente (Zhang *et al.*, 2013).

Segundo Woeller (2007), enzimas e proteínas envolvidas na rota metabólica do ácido fólico, como MTHFR (Metilenotetrahidrofolato redutase), TYMS (Timidilato sintase), MTR (Metionina sintase) e o RFCh (carreador de folato reduzido humano), são críticas para processos de metilação e atuam na síntese e reparo de DNA (Figura 6).

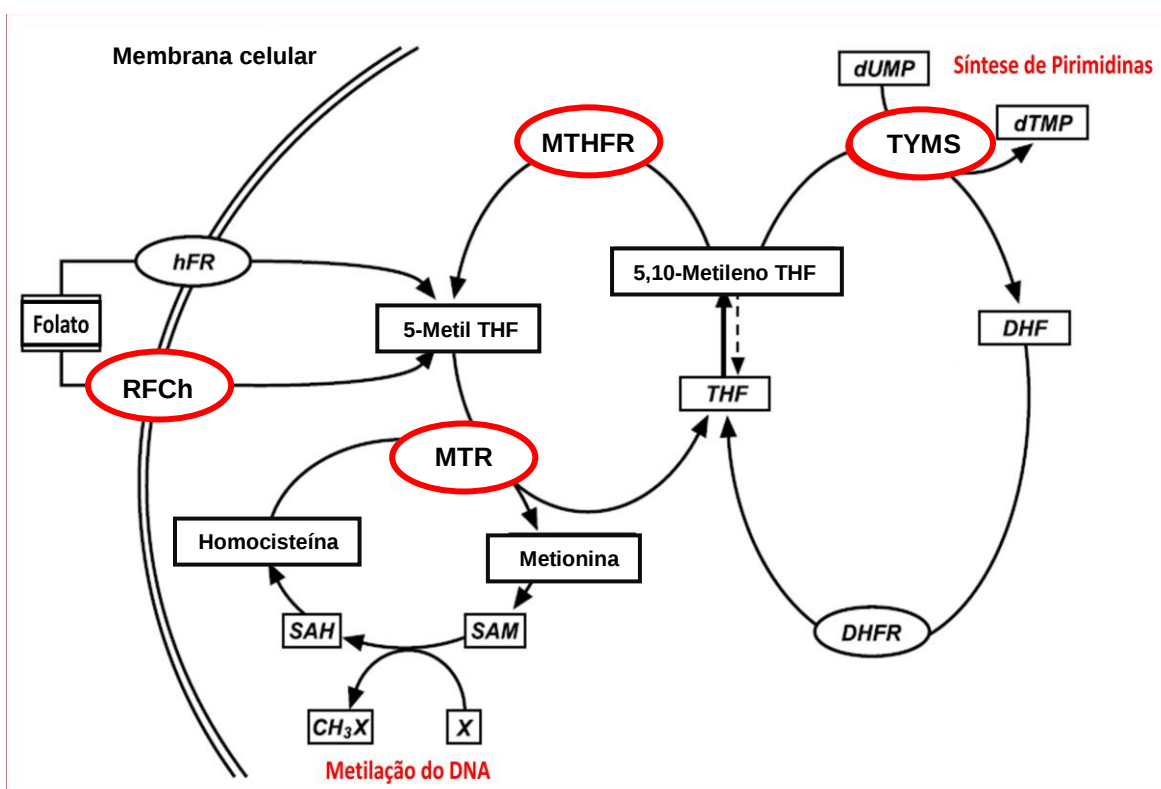


Figura 6: Via metabólica do ácido fólico em humanos. Adaptado de Ulrich (2005). A figura mostra as principais etapas do metabolismo do ácido fólico, desde sua assimilação pelo RFCh à participação das enzimas *TYMS*, *MTHFR* e *MTR* na biossíntese de nucleotídeos e no processo de metilação. A deficiência de folato pode provocar hipometilação genômica, que conduz à ativação e transcrição inadequada de proto-oncogene e conversão dos mesmos a oncogenes, iniciando dessa forma o processo carcinogênico.

Entretanto, o ácido fólico não é encontrado naturalmente nos tecidos vivos, é necessária a sua redução *in vivo* a formas intermediárias dihidrofolato e

tetrahidrofolato, pela adição de átomos de hidrogênio nas posições 7 e 8 e 5, 6, 7 e 8, para tornar-se biologicamente ativo (Baluz *et al.*, 2002). Dessa forma, o folato entra na célula via RFC, a MTHFR, por sua vez, converte irreversivelmente o 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF). A MTR é responsável pela remetilação da homocisteína à metionina, utilizando como cosubstrato o 5-MTHF. A TYMS participa da biossíntese de nucleotídeos e da conversão de dUMP (uridina monofosfato) a dTMP (timidina monofosfato). Consequentemente, a deficiência de folato contribui para lesões e síntese inadequada do DNA, causadas pela incorporação errada do uracil no DNA, podendo levar ao surgimento de sítios frágeis e possíveis quebras cromossômicas, além de causar prejuízos no processo de metilação, podendo causar ativação de proto-oncogenes em oncogenes (Ulrich *et al.*, 2005; Woeller *et al.*, 2007).

O estudo dos polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo de nutrientes essenciais, como o folato, contribui para a identificação de potenciais fatores de suscetibilidade gênica e prognóstico no desenvolvimento do câncer, além de contribuir na análise do envolvimento dos mecanismos de metilação, síntese, reparo de DNA, e mecanismos que conduzem a rearranjos cromossômicos na gênese do câncer (De Lima *et al.*, 2010).

O gene *MTHFR* é codificador da enzima 5-metilenotetrahidrofolato redutase e localiza-se no 1p36.3, estando constituído por 11 éxons, que codificam uma flavoproteína citosólica. A proteína produzida possui ação catalisadora da redução da 5,10-metilenotetraidrofolato para 5-metiltetraidrofolato (forma circulante do ácido fólico), na presença de NADPH. O metabolito 5-metiltetraidrofolato é o principal doador de radical metil na remetilação da

homocisteína para metionina, que por sua vez é a precursora da síntese de S-adenosilmetionina (SAM), mais importante doador celular de radical metila para DNA, RNA, proteínas e para a síntese de fosfolípidos (Zhu *et al.*, 2013).

O gene *MTHFR* é um gene polimórfico, apresentando dez polimorfismos descritos até o momento, sendo apenas dois deles mais intensamente investigados, o C677T e o A1298C (Delboni *et al.*, 2011).

A troca de citosina (C) por timina (T) na posição 677 do gene *MTHFR* (C→T), localizada no éxon 4, promove a substituição de alanina para valina no domínio catalítico N-terminal no códon 222 da proteína. Essa substituição altera o sítio de ligação da flavina adenina dinucleotídeo (FAD), um importante cofator para a *MTHFR*. A presença desse polimorfismo torna a enzima termolábil e, em heterozigose (C/T), reduz a atividade da enzima em 35% em relação à presença do genótipo selvagem (C/C), enquanto que em homozigose (T/T) essa perda atinge 70% de sua atividade (Frosst *et al.*, 1995; Guenther *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2008; Delboni *et al.*, 2011; Herkenhoff *et al.*, 2012; Nassiri *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013).

O polimorfismo A1298C promove a substituição de uma adenina por uma citosina (A→C) no nucleotídeo 1298 localizado no éxon 7, resultando na troca do aminoácido glutamato por alanina no códon 429. A substituição do aminoácido ocorre no domínio regulatório C-terminal da enzima, também influenciando na atividade enzimática, porém, com menor impacto que o polimorfismo C677T (Weisberg *et al.*, 2001).

Observações bioquímicas indicam que a presença do genótipo mutante 677TT e a consequente redução da atividade da enzima *MTHFR* estão associadas a hiperhomocisteinemia e redução dos níveis de metionina

plasmática. Tal mutação resulta em retardo no desenvolvimento, anomalias neurológicas e complicações vasculares. Segundo Kluijtmann *et al.* (1996), homozigotos para a mutação (TT), podem apresentar risco três vezes maior de ter uma doença cardiovascular, representando um importante fator de risco genético para doenças vasculares. Wenstrom *et al.* (2001) pesquisaram malformações cardíacas congênitas e demonstraram que 50% dos defeitos isolados estavam relacionados com a mutação *MTHFR* C677T e com o nível elevado de homocisteína plasmática. Além de relatos sobre as doenças coronarianas, vários estudos demonstraram a relação do polimorfismos no gene *MTHFR* e aumento dos níveis de homocisteína plasmática com distúrbios do tubo neural (NTD) (Beluz *et al.*, 2002; Mezzomo *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013). van der Put, (1996) observou que mães homozigotas (TT) e filhos homozigotos (TT) para mutação *MTHFR* C677T, teriam risco até sete vezes maior para espinha bífida.

Por outro lado, a presença da mutação em *MTHFR* A1298C, tanto no seu estado homozigoto mutante (1298CC) ou heterozigótico (1298AC), parece não ocasionar elevações do nível da homocisteína plasmática. Entretanto, a combinação em heterozigose de ambas mutações (duplo heterozigoto), C677T e A1298C, produz um genótipo 677CT/1298AC que resulta na elevação significativa do nível da homocisteína plasmáticas (van der Put, 1998).

Outras anormalidades, como o câncer, por exemplo, também foram estudadas quanto à associação com polimorfismos do gene *MTHFR* e foi observado que os níveis de folato podem influenciar o risco de desenvolver a neoplasia (KIM, 1999).

Interações entre leucemogênese e o polimorfismo do gene *MTHFR* foram demonstrados (Pereira *et al.*, 2004; Zanrosso *et al.*, 2005 e Ramos *et al.*, 2006).

As variantes 677TT e 1298CC foram associadas à diminuição do risco para câncer colorretal (Sharp & Little, 2004). Sirachainan *et al.* (2008) analisaram os mesmos polimorfismos em crianças tailandesas com tumores do SNC e relataram que o homozigoto CC do polimorfismo *MTHFR* A1298C conferiu um risco ao desenvolvimento de tumores embrionários do SNC. Segundo Delboni *et al.* (2011), a presença do alelo C do polimorfismo C677T confere proteção aos indivíduos, reduzindo o risco para desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço em 3,54 vezes, todavia o mesmo não foi observado para o polimorfismo A1298C. Galbiatti *et al.* (2012) concorda que o polimorfismo do *MTHFR* pareça modular o risco de câncer de cabeça e pescoço. Enquanto Nassiri *et al.* (2013) demonstraram a importância do estudo do polimorfismo da *MTHFR* e o desenvolvimento do câncer colorretal. Zhu *et al.* (2013) realizou uma meta-análise, sugerindo que o polimorfismo *MTHFR* C677T pode ser um marcador genético para um risco aumentado de câncer de pulmão.

A distribuição geográfica e étnica da mutação C677T vêm sendo estudada, demonstrando uma frequência de 20% para o genótipo TT em uma população chinesa, de 20-29% em uma população da Itália, 4 a 7% na Finlândia, 16% no Reino Unido, 8 a 10% na França, 11% na Alemanha e 32% no México. Entre os africanos e afrodescendentes a frequência desse genótipo é relativamente baixa (3%) (Wilcken *et al.*, 2003; Ferrara *et al.*, 2009). De Lima *et al.* (2010) observou uma frequência de 13,9% em uma população pernambucana (Brasil) e Ramos *et al.* (2006) sugeriu uma frequência entre 0,30-0,31 para 677T na mesma população.

O alelo 1298C apresenta faixas de frequências entre 0,17 e 0,19 nas populações asiáticas e entre 0,27 a 0,36 na Europa Ocidental (Robien *et al.*,

2003). Entre populações da América do Sul, o alelo 1298C apresentou uma frequência entre 0,23 e 0,26 (Ramos *et al.*, 2006).

O gene *MTR* codifica a enzima 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferase, também chamada de metionina sintase (MTR). Esse gene possui 4Kb e foi localizado na região 1q43, sendo constituído por 12 éxons. Sua região codificadora contém 3.795 pares de base, que codificam uma proteína de 1265 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 140kDa (Chen *et al.*, 1997; Leclerc *et al.*, 1998; Mathews *et al.*, 1998).

A enzima possui três domínios que a constituem: um domínio N-terminal, que se liga a substrato na reação; um domínio central, extremamente conservado, onde ocorre a ligação à cobalamina; e um domínio C-terminal, que constitui o domínio regulatório da enzima e interage com S-adenosilmetionina (Chen *et al.*, 1997; Matthews *et al.*, 1998).

A MTR é essencial para a manutenção adequada da metionina e do folato intracelular, bem como para assegurar que as concentrações de homocisteína não atinjam níveis tóxicos (van Der Put *et al.*, 1997). A enzima cataliza a remetilação da homocisteína para metionina através do uso da metilcobalamina (vitamina B12) e o 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) como cosubstratos. Esses cosubstratos atuam como doadores de grupamentos metil nessa reação, produzindo simultaneamente o tetrahidrofolato (THF) que, por sua vez, é reduzido novamente à 5,10 metilenotetrahidrofolato pela serinahidroximetil transferase (SHMT) (Li *et al.*, 1996; Niclot *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2013). A atividade da *MTR* é dependente de uma segunda proteína: a metionina sintase redutase (MTRR), que mantém a *MTR* ligada à cobalamina em seu estado ativo totalmente reduzido. Quando a cobalamina está oxidada, a *MTRR* catalisa a metilação redutiva desta,

utilizando S-adenosilmetionina como um doador de metil, para regenerar metilcobalamina (Olteanu & Banerjee, 2001; Zhao *et al.*, 2013).

O polimorfismo mais comum no gene *MTR* é o A2756G, resultante de uma mutação de ponto que leva a uma transição de A para G na posição 2756pb (2756 A→G) no éxon 8 do gene da *MTR*. Essa mutação leva à substituição de ácido aspártico por glicina no códon 919 da proteína (van Der Put *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013).

O ácido aspártico é fortemente polar e localiza-se na α hélix entre o sítio de ligação à cobalamina, no domínio central, e o domínio C-terminal regulatório, região onde também se ligam proteínas que reduzem o cofator. A mudança para aminoácido não polar (glicina) acarreta perturbações na estrutura tridimensional e função da proteína (Leclerc *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1997; van Der Put *et al.*, 1997).

A presença do polimorfismo A2756G provavelmente leva a uma oxidação inadequada do cofator (cobalamina), com consequente redução da atividade da *MTR*, causando acúmulo do substrato para a enzima, o 5-metiltetrahydrofolato, e deficiência do derivado, incluindo o 5,10-metilenotetrahydrofolato, requerido para a biossíntese de timidilatos. O aumento do nível de homocisteína celular também é observado, sendo crítico para a manutenção do nível intracelular adequado de S-adenosilmetionina, importante na metilação do DNA e consequente efeito supressor do câncer (Chen *et al.*, 1997; De Lima *et al.*, 2010; Hosseini *et al.*, 2013).

O aumento dos níveis sanguíneos de homocisteína tem sido associado à maior probabilidade de desenvolver doenças cardiovasculares, defeitos congênitos e síndrome de Down, além de induzir o desenvolvimento de diversos

tipos de câncer (Carmel & Jacobsen, 2001; Watkins *et al.*, 2002). Alguns estudos têm demonstrado associações entre o polimorfismo do gene *MTR* e o câncer de colón (Chen *et al.*, 2006), câncer de pulmão (Shi *et al.*, 2005) e câncer de mama (Lissowska *et al.*, 2007). Segundo Hosseini *et al.* (2013), o genótipo AG do gene *MTR* está fortemente associado com o risco de câncer de mama, além disso, o autor aponta relação entre a presença de GG do gene *MTR* e aumento do risco de desenvolver essa neoplasia.

Matsuo *et al.* (2001) observaram que a mutação A2756G pode atuar como fator de risco no desenvolvimento de linfomas malignos, enquanto Skibola *et al.* (2002) sugerem que a mutação em questão tem efeito protetor no desenvolvimento de leucemia linfóide aguda. Ding *et al.* (2013) afirmam que não há associação entre o polimorfismo A2756G *MTR* e o câncer colo retal. Adicionalmente, Zhao *et al.* (2013) não apoiou uma possível associação do polimorfismo A2756G do *MTR* com o câncer do sistema digestivo. Entretanto, De Lima *et al.* (2010) apresentaram evidências preliminares para uma associação entre o polimorfismo A2756G *MTR* e a susceptibilidade ao retinoblastoma em uma população brasileira, devido à sub representação do homozigoto selvagem (AA) em relação ao genótipo heterozigoto (AG), com um sugerido efeito dominante do alelo G no risco de desenvolver a doença.

O genótipo homozigoto variante 2756GG foi identificado em 2% a 3% de asiáticos (van Der Put *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1997; Zhang e Daí, 2001; Le Marchand *et al.*, 2002), em 3% de europeus e em 6% de afro-americanos (Sharp e Little, 2004; *Human Genome Epidemiology Network in* <http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/default.htm>). Segundo Watkins *et al.* (2002), a frequência do genótipo GG é cerca de 8% na Holanda, 2% na Irlanda do

Norte e 4% nos Estados Unidos e Canadá, o alelo mutante varia de 15 a 24% na Europa e 15 a 18% nos Estados Unidos e Canadá. Na população pernambucana, De Lima *et al.* (2010) observaram frequência de 3% para o genótipo GG do *MTR*.

O gene *TYMS*, codificador da enzima timidilato sintase (TYMS), localiza-se no 18p11.32, cujo produto desse gene consiste de uma proteína de 313 aminoácidos, com peso molecular aproximado de 35,7 kDa (Hishida *et al.*, 2003).

A TYMS catalisa a conversão intracelular de 2'-deoksiuridina 5'-monofosfato (dUMP) a 2'-deoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP), sendo a única fonte de timidilato, precursor essencial para a síntese de DNA. Para essa conversão, a enzima utiliza o 5,10-metilenotetrahidrofolato como substrato e doador de hidroximetil, levando a produção de dihidrofolato. Dessa forma, a TYMS compete com a *MTHFR* pelo 5,10-metilenotetrahidrofolato, exercendo função crucial na manutenção do fornecimento equilibrado de desoxinucleotídeos através da síntese *de novo* de pirimidinas, importante nos processos de síntese e reparo do DNA (Candelaria *et al.*, 2005; Kanaan *et al.*, 2009; Lupo *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012).

O gene *TYMS* possui um polimorfismo na região promotora acentuadora, mais especificamente na região 5' não traduzida (5'-URT), imediatamente anterior ao códon de iniciação ATG (Kaneda *et al.*, 1987). Essa sequência polimórfica consiste de 28pb repetidos duas (2R) ou três (3R) vezes *em tandem* (Skibola *et al.*, 2002) (Figura 7).

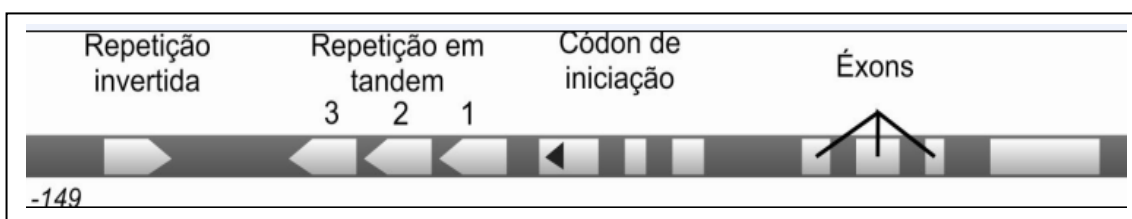


Figura 7: Representação esquemática do gene *TYMS*. Adaptado de Gibson *et al.*, 2006.

A presença das sequências *em tandem* 3R e 2R está associada ao aumento da transcrição do RNAm e da expressão da proteína, consequentemente, levando a uma expressão aumentada do gene e maior conversão de dUMP em dTMP. Assim, a região polimórfica parece funcional, podendo modular a expressão da proteína, com maior eficiência conferida pelo alelo 3R, o que garante uma correta incorporação de pirimidinas no DNA (Kawakami, 1999; Hishida *et al.*, 2003). Entretanto, a inibição da enzima resulta na diminuição da quantidade de dTMP, favorecendo processos de formação de sítios frágeis, indução de quebras cromossômicas e morte celular (Marsh, 2005; Giovannetti *et al.*, 2008; Lupo *et al.*, 2012; Swartz *et al.*, 2013). Portanto, pode-se afirmar que esta enzima é essencial para o metabolismo celular, principalmente em tecidos que possuem grande poder de proliferação, como aqueles envolvidos com a hematopoiese (Skibola *et al.*, 2002).

Segundo Pullarkat *et al.* (2001), indivíduos homozigotos 3R/3R, portadores de câncer colorretal, apresentam até 3,6 mais RNAm de *TYMS* em relação àqueles que eram homozigotos 2R/2R, e 1,7 vezes mais do que as heterozigotos 2R/3R. Tanaka *et al.* (2011) observaram que a baixa expressão do gene *TYMS* estava associada ao desenvolvimento de adenocarcinoma de pulmão. Swartz *et al.* (2013) também observou que a baixa expressão de *TYMS* pode influenciar o risco de câncer de pulmão em fumantes antigos. Krajcinovic *et al.* (2002) mostraram que a presença de polimorfismos parece influenciar a expressão do gene em crianças com leucemia linfóide aguda, pois homozigotos 3R apresentaram pior prognóstico em relação àqueles com presença de pelo menos um alelo 2R. Adicionalmente, Etheredge *et al.* (2012) sugeriram que

alterações no gene *TYMS* em gestantes parecem não estar relacionadas ao risco de defeitos do tubo neural nos seus filhos.

O genótipo homozigoto 3R/3R foi identificado em 2% a 3% dos asiáticos, em 3% de Europeus e em 6% de Afro-americanos. Em brancos norte-americanos a frequência do genótipo 2R/2R variou de 19% a 23%; e variou de 14% a 20% em africanos e em afro-americanos (Horie *et al.*, 1995; Marsh *et al.*, 1999; 2000; Luo *et al.*, 2002; Trinh *et al.*, 2002; Skibola *et al.*, 2002; Ulrich *et al.*, 2002). Alguns alelos raros contendo quatro (4R), cinco (5R) ou nove (9R) repetições também foram descritos associados a uma maior expressão do gene *TYMS* (Marsh *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2002). A frequência do alelo 3R variou de 0,38 a 0,54 entre caucasianos, de 0,49 entre quenianos e 0,82 entre chineses (Marsh *et al.*, 1999; 2000).

O gene *SLC19A1* é responsável por codificar o carreador de folato reduzido (RFCh). Esse gene possui 22,5 kb e está localizado no cromossomo 21 (21q22.2-q22.3), consistindo de 25 éxons, que codificam uma glicoproteína transmembrana de 65 kDa, com 591 resíduos de aminoácidos (Chango *et al.*, 2000).

A transcrição da proteína RFCh é iniciada a partir de quatro diferentes promotores (designados A, B, C e D) (Matherly, 2007), através de vários éxons 5' não codificantes, importantes no processo de *splicing* alternativo (Whetstine, 2002; Zhang, 1998). Ao menos 18 diferentes transcritos RFC foram relatados, cujas funções não são claras, embora conexões com expressões em tecidos específicos fossem sugeridas (Whetstine, 2002).

O RFCh possui uma estrutura simétrica, composta por 12 domínios transmembranares em hélices, que formam canais na membrana através dos

quais o 5-metiltetrahidrofolato atinge o meio intracitoplasmático. Ambos os domínios, N- e C- terminais, e uma grande alça hidrofílica entre as hélices seis e sete, estão localizados no citoplasma (Figura 8). Tais domínios citoplasmáticos parecem não ser essenciais para o transporte do substrato, mas são importantes para a biogênese e localização da molécula (Hresko *et al.*, 1994; Sadlish *et al.*, 2002; Matherly *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2009).

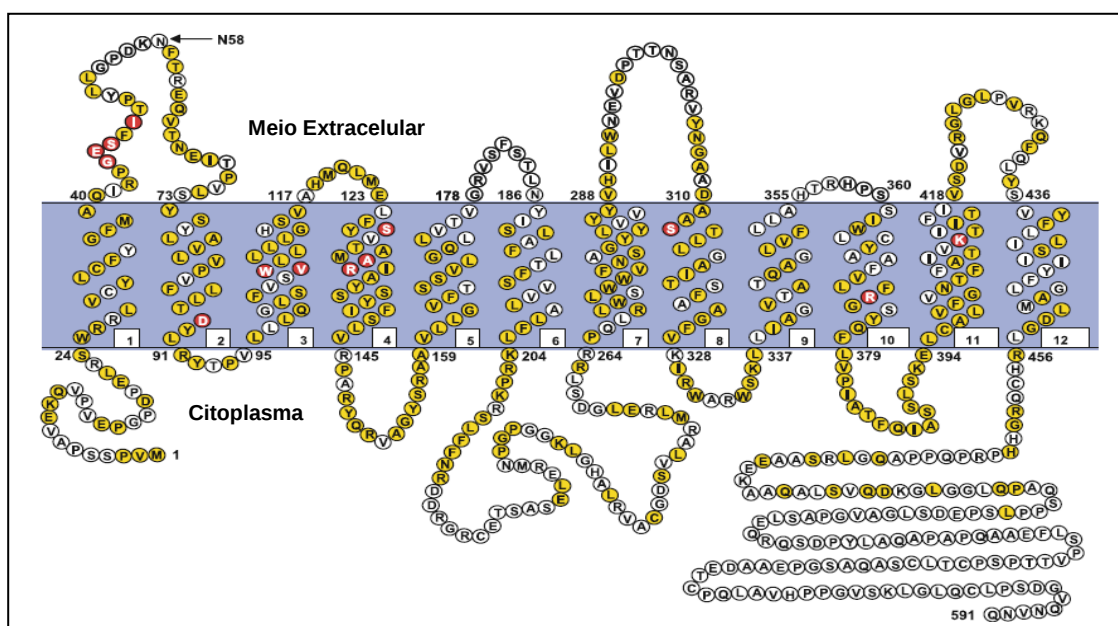


Figura 8: Modelo proposto para o RFCh, mostrando todos os aminoácidos que compõem sua estrutura (Matherly *et al.*, 2007; Hou & Matherly, 2009).

Além de importante transportador de drogas antifolato usadas para tratamento quimioterápico do câncer, como o metotrexato (MTX), pemetrexede dissódico (Alimta) e raltitrexato (Tumodex) (Matherly & Goldman, 2003; Matherly *et al.*, 2007; Niedzielska *et al.*, 2013), o RFC 1, ou carreador de folato reduzido humano (RFCh), desempenha um papel essencial no transporte intracelular do folato reduzido, sendo o principal responsável por esse transporte em células e tecidos de mamíferos (Prasad *et al.*, 1995). Essa proteína é expressa em todas as células, mas, apesar de sua onipresença, a absorção do folato ocorre principalmente no intestino (Sierra *et al.*, 1999; Sirotnak *et al.*, 1999; Melo, 2004).

Entretanto, as células de mamíferos são incapazes de sintetizar folatos *de novo*, portanto, a internalização de folato extracelular é essencial. A absorção do folato¹ ocorre por hidrólise do poliglutamato² para monoglutamato³ através da enzima glutamato carboxipeptidase 2 (GCP2) (Figura 9). Em seguida, a forma monoglutamato é conduzida pelo transportador para o interior dos enterócitos. Os processos de hidrólise e transporte devem ocorrer em pH ideal (pH 6,0), no microambiente da vilosidade do jejuno. No enterócito, os monoglutamatos são convertidos em 5-metiltetrahidrofolato e transportados para a corrente sanguínea. O 5-metiltetrahidrofolato é a maior fração de folato circulante no plasma e apresenta alta afinidade por receptores de folato na membrana celular. Sendo assim, a absorção celular ocorre por meio do RFCh, utilizando como carga negativa o glutamato (Caro, 2007; Zhao *et al.*, 2009; Green, 2010; Laanpere *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2013).

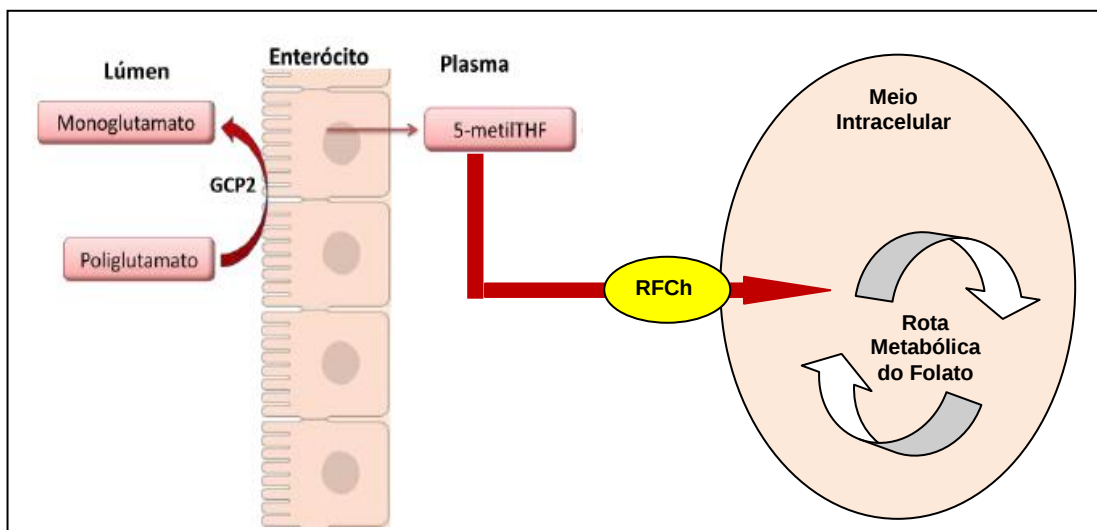


Figura 9: Processo de absorção do folato (Adaptado de Pietrzik, 2010).

¹ Composto por um anel pteridina ligado ao ácido paraaminobenzóico e unido a uma ou mais moléculas de ácido glutâmico (Zhao *et al.*, 2009).

² Forma mais abundante de folato em condições fisiológicas.

³ Forma mais estável do folato, necessária para absorção através das células do jejuno.

O RFCh deve funcionar eficientemente para assegurar uma adequada concentração de ácido fólico intracelular, sendo necessário que o mecanismo que regula essa absorção seja extremamente funcional (O`Leary *et al.*, 2006). Contudo, estudos vêm caracterizando mutações presentes em domínios essenciais de genes associados à absorção do folato. Provavelmente, tais sequências gênicas variantes levam a baixos níveis de expressão ou perda da função de transporte do receptor, ou podem representar menos afinidade com a forma reduzida do ácido fólico, levando a concentrações alteradas dos produtos derivados da via metabólica do folato (Fillon-Emery *et al.*, 2004; Niedzielska *et al.*, 2013).

Em 2000, Chango *et al.* identificaram o polimorfismo G80A no gene do RFCh, cujo estudo avaliou o papel desse polimorfismo no transporte intracelular da forma reduzida do ácido fólico. O polimorfismo G80A consiste da transição de uma guanina (G) por uma adenina (A) (80 G→A) no nucleotídeo 80 do éxon 2 do gene. A mutação leva a uma substituição de uma arginina por uma histidina na posição 27, no primeiro domínio transmembrana da proteína RFCh, resultando na diminuição da afinidade do receptor e alterações no transporte transmembrana de ácido fólico (Chango *et al.*, 2000; Niedzielska *et al.*, 2013).

Segundo a literatura, o polimorfismo G80A no gene *SLC19A1* e o consequente dano à absorção transmembrana do folato podem contribuir para o desenvolvimento de condições fisiopatológicas associadas com a deficiência desse nutriente, incluindo doenças cardiovasculares, anormalidades fetais, doenças neurológicas e câncer (Matherly *et al.*, 2004), os quais podem ainda, ser agravados por mudanças na atividade catalítica de enzimas chaves no metabolismo do ácido fólico (Lucock *et al.*, 2000 ; Matherly *et al.*, 2004).

Vieira *et al.* (2008) mostraram que variações em *SLC19A1* podem contribuir para o surgimento de fissuras labiais. De Marco *et al.* (2003) e O`Leary *et al.* (2005) sugerem que este polimorfismo é fator de risco para malformações congênitas, como os defeitos do tubo neural. French *et al.*, (2003) apontam um possível papel do ácido fólico no desenvolvimento de neuroblastoma. Autores sugerem que o polimorfismo *SLC19A1* G80A parece ter uma associação causal com câncer esofágico e gástrico (Wang *et al.*, 2007) além de modular o risco de câncer de cabeça e pescoço (Galbiatti *et al.*, 2010; 2012) e adenoma colorretal (Levine *et al.*, 2011), no entanto, não foi observada associação com o câncer de próstata (Collin *et al.*, 2009).

Adicionalmente, Hayashi *et al.*, (2013) observaram que pacientes com artrite reumatoide portadores do alelo G podem apresentar uma menor absorção intracelular do MTX quando comparado com pacientes portadores do alelo A, indicando pobre eficácia da droga nesses pacientes com o alelo G. Em concordância, Laverdière *et al.* (2002) relataram que pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda tratados com MTX, homozigotos ou heterozigotos para o alelo A, têm uma maior propensão para efeitos adversos do que pacientes com o genótipo GG.

Segundo Rady *et al.* (2001), a frequência dos alelos *SLC19A1* G80A não se apresentaram diferentes entre grupos étnicos judeus, caucasianos, afro americanos e hispânicos. Entretanto, O`Leary *et al.* (2005) mostraram que a frequência do genótipo 80GG é de 30% em euro descendentes que vivem nos Estados Unidos e de 20% em negros africanos.

Embora o câncer seja considerado uma importante causa de morte entre as crianças, as taxas de sobrevivência de pacientes vem aumentando

continuamente nas últimas décadas (Harmon *et al.*, 2011; Ljungman *et al.*, 2011; Lukasa *et al.*, 2012).

Um aumento significativo nas taxas de sobrevida dessas crianças com câncer pode ser decorrente de uma constante busca pelo aperfeiçoamento técnico para a melhoria da resposta à terapia através da personalização do tratamento quimioterápico, visando minimizar os efeitos relacionados, juntamente com a quimioterapia intensificada e terapia de suporte melhorada, que tem aumentado a taxa de completa remissão. Contudo, avanços nas taxas de cura em crianças também poderiam ser atribuídos à identificação de fatores prognósticos (de Deus *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013).

Assim, crescentes interesses têm surgido sobre a associação do genótipo com o risco de desenvolver doenças, como determinante de sua apresentação e evolução, assim como a influência do genótipo como determinante das respostas individuais ao tratamento (Biolo *et al.*, 2004).

Dada a importância do ácido fólico no risco de câncer (Sharp 2004), estudos recentes têm sugerido que a toxicidade de drogas antifolato pode ser afetada por polimorfismos herdados de nucleotídeo único (SNPs) nos genes de metabolização de folato (D'Angelo *et al.*, 2013). Sendo assim, polimorfismos de genes para enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo desse nutriente, *MTHFR C677T e A1298C*, *MTR A2756G*, *TYMS 2R/3R* e *SLC19A1*, podem ser considerados potentes fatores prognóstico, influenciando na evolução da doença, na eficácia e nos efeitos tóxicos do tratamento (Ongaro 2009; Eissa *et al.*, 2013).

As drogas são transportadas através da membrana celular pelo *RFC1*. Alterações nas propriedades de transporte desse carreador vêm sendo reconhecidas como um mecanismo de resistência a drogas antifolato (Laverdiere

2002). A enzima TYMS concorre pelo substrato com MTHFR para a conversão intracelular de dUMP para dTMP, um passo limitante na síntese de DNA, por isso, é um importante alvo para drogas quimioterápicas no tratamento de tumores sólidos (Chen *et al.*, 2003). A MTHFR é uma enzima chave na via de metabolismo de folato e polimorfismos *MTHFR* têm sido relacionados com o resultado do tratamento em pacientes com câncer. Variantes *MTR A2756G* afetam a metilação do DNA, exercendo potencial impacto no comportamento do tumor (Matakidou *et al.*, 2007). Contudo, as observações de que polimorfismos desta via podem afetar a eficácia de drogas citotóxicas fornecem uma forte justificativa para avaliar tais variantes como fatores prognósticos.

2.3 Estudos citogenéticos em tumores sólidos embrionários

As alterações cromossômicas observadas em neoplasias parecem desempenhar um papel marcante no processo carcinogênico. Essas alterações costumam envolver regiões cromossômicas onde oncogenes foram localizados. Nestas regiões, ou próximo a elas, foram identificados sítios frágeis, onde agentes carcinogênicos poderiam atuar, determinando quebras ou rearranjos cromossômicos. Se essas mutações determinarem vantagens proliferativas a uma célula, ocorrerá a proliferação desta. Nas divisões celulares subsequentes, se os defeitos cromossômicos representarem mudanças vantajosas para a sobrevivência celular, o processo continuará, levando ao desenvolvimento de clones em um tumor, garantindo o crescimento tumoral, a infiltração de tecidos adjacentes e a capacidade de metástases à distância (Lopes *et al.*, 2002).

Com o desenvolvimento de técnicas laboratoriais, muitos conhecimentos têm sido adquiridos em relação à biologia do câncer, sendo possível identificar e analisar lesões genéticas as quais determinam a transformação maligna, a progressão da doença, a resposta terapêutica e o prognóstico. Porém, a análise cromossômica em tumores sólidos é difícil e, portanto, as informações citogenéticas são limitadas (Sisley, 1998).

Contudo, apesar dos tumores sólidos pediátricos não serem bem caracterizados citogeneticamente como as doenças hematológicas, a compreensão sobre o papel das alterações cromossômicas no desenvolvimento dessas neoplasias vêm emergindo nesse âmbito. Alguns autores vêm mostrando a importância clínica da análise cromossômica, principalmente como potentes marcadores prognósticos, permitindo a estratificação dos pacientes em grupos de

risco, o que possibilita direcionar o tratamento e torná-lo mais eficaz (Schwab *et al.*, 2003; Yong, 2009).

A caracterização citogenética do neuroblastoma é complexa, porém têm-se mostrado importante na definição do potencial comportamento clínico desse tumor, representando um fator prognóstico importante na determinação do tratamento. Estudos cromossômicos em casos de neuroblastoma apontam a perda distal 1p como anomalia citogenética mais comum, observada em casos graves com doença avançada e pior evolução. Outras deleções associadas ao NB envolvem as regiões 4p, 6q, 10q, 19p, 19q, 11q e 14q, que se relacionam com uma menor sobrevida livre de doença. Duplicação da região 17q é comumente observada em NB primário, sendo relacionada com estádios mais avançados, comportamento mais agressivo da doença e pior prognóstico (Mertens *et al.*, 1994; Weinstein *et al.*, 2003; Cartum *et al.*, 2004; Janoueix-Lerosey *et al.*, 2009; Mueller *et al.*, 2009; Sridhar *et al.*, 2013).

Outros marcadores também são frequentes em casos de neuroblastoma, como a amplificação do gene *n-myc*, localizado na região 2p24, apresentado como cromossomos *doubles minutes* ou regiões de coloração homogênea. A amplificação do gene *n-myc* está associada à rápida progressão da doença e metástase, contribuindo para um comportamento clinicamente agressivo de um NB de alto risco e pior prognóstico (Mertens *et al.*, 1994; Weinstein *et al.*, 2003; Cartum *et al.*, 2004; Attiyeh *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2010).

As variações de ploidia também são observadas em pacientes com neuroblastoma. Tumores com cariótipos hiperdiplóides, principalmente com constituição *near-triplóide*, com alterações numéricas, representam bom prognóstico. A maioria dos casos de regressão espontânea do tumor e maiores

taxas de sobrevida concentra-se nesse grupo, geralmente observado em menores de um ano de idade (Cartum *et al.*, 2004). Ao passo que tumores *near*-diplóides ou *near*-tetraplóides com rearranjos estruturais, incluindo deleções 1p ou 11q, ganho 17q e amplificação de *n-myc*, estão associados à agressividade da doença e mau prognóstico (Mertens *et al.*, 1994; Weinstein *et al.*, 2003; Janoueix-Lerosey *et al.*, 2009; Stigliani *et al.*, 2012).

Segundo Cartum *et al.* (2004), a associação dos fatores genéticos descritos foi estabelecida como critério prognóstico do neuroblastoma em três categorias, conforme observado na tabela 6.

Tabela 6: Categorias de critério prognóstico do neuroblastoma.

Cariótipo Triplóide	Sem amplificação do gene <i>n-myc</i> e sem deleção 1p	Pacientes menores de um ano de idade, doença localizada e de bom prognóstico.
Cariótipo diplóide	Sem amplificação do <i>n-myc</i> e sem deleção 1p	Pacientes com mais de um ano de idade, estádios mais avançados da doença, lentamente progressiva e frequentemente fatal.
Cariótipo diplóide	Com deleção 1p e/ou amplificação do <i>n-myc</i>	Pacientes com mais de um ano de idade, estádios avançados da doença, rapidamente progressiva.

Cartom *et al.* (2004)

No que diz respeito ao retinoblastoma, a principal alteração citogenética descrita em pacientes com essa neoplasia é a deleção do braço longo do cromossomo 13, região onde está localizado o gene supressor tumoral *RB1*. A supressão de 13q, decorrente de perdas ou mutações que resultam na inativação bialélica do gene *RB1*, parece ser a alteração responsável diretamente pelo desenvolvimento do retinoblastoma. Entretanto, eventos genéticos adicionais em

células tumorais são necessários para a completa transformação tumoral (Amare Kadam *et al.*, 2004).

Embora a perda da função do gene *RB1* (13q14) seja observada na maioria dos casos de retinoblastoma. Ao nível citogenético, no entanto, as alterações da região 13q são vistas em menos de 25% dos casos, predominando alterações em 1q e i(6p), observadas em 50-60% dos casos (Mertens *et al.*, 1994; Paderova *et al.*, 2007). Autores apontam o frequente envolvimento de alterações cromossômicas adicionais em pacientes com retinoblastoma, entre elas cópias extras de 1q e 6p, deleções envolvendo 5q (-5q) e monossomia do cromossomo 16, além de alterações envolvendo 1p (+/- 1p), ganho de 2p (+2p) e 19q (+19q), deleções no cromossomo 16 (-16/-16q), e presença de *double minutes*. Alterações em 9p e 16p estão envolvidos na via de pRb (Squire *et al.*, 1984; Potluri *et al.*, 1986; Mairal *et al.*, 2000; Amare Kadam *et al.*, 2004; Zielinski *et al.*, 2005; Paderova *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2012). Em adição, Pandova *et al.* (2007) relataram pontos de quebra recorrentes envolvendo 4p, 11p, 17q e 20q.

Segundo Amare Kadam *et al.* (2004) e Mairal *et al.* (2000), as alterações cromossômicas citadas e mutações genéticas resultantes, juntamente com eventos de mutação do gene *RB1*, provavelmente contribuem sinergicamente para os demais eventos necessários para a transformação maligna, desenvolvimento e a progressão da doença. Contudo, possíveis funções destas anormalidades cromossômicas no desenvolvimento do tumor ainda são discutidas, sendo muito difícil determinar a possível relação com a agressividade da doença e a respectiva alteração citogenética envolvida. Novos estudos são necessários para avaliar a presença de alterações citogenéticas e sua associação

com o estágio da doença, visando investigar o possível papel que estas alterações desempenham na disseminação e na progressão da doença.

Quanto ao tumor de Wilms, sabe-se hoje que diversos eventos genéticos estão envolvidos na gênese do tumor, eventos estes que acabam por interferir na função de genes relacionados aos processos de proliferação e de diferenciação celular levando, conseqüentemente, ao desenvolvimento tumoral e seu fenótipo. Diferentes genes envolvidos direta ou indiretamente nestes processos já foram identificados e parece haver uma participação preferencial de genes supressores de tumor com perda de função em relação à ativação de oncogenes (Grundy *et al.*, 2002).

As associações dos tumores de Wilms com síndromes relacionadas a anomalias de desenvolvimento do trato geniturinário foram de fundamental importância na identificação das alterações genéticas relacionadas a estes tumores. Por exemplo, a associação do tumor de Wilms com a aniridia, anormalidades geniturinárias, retardo mental (WAGR), permitiu a detecção de uma região cromossômica 11p, comum a estas características. Essa região está deletada em cerca de 5-40% do tumor de Wilms por perda de heterozigose (Green *et al.*, 1996; Strong, 2003; Fukuzawa e Reeve, 2007). Dois locus independentes em 11p se mostraram relacionados ao tumor de Wilms: 11p13 e 11p15, onde estão mapeados os genes *WT1* e *WT2*. Mutações ou deleções em 11p13 estão presentes em somente 10 a 20% dos TW, enquanto que alterações em 11p15 são mais frequentes nos TW esporádicos.

O estudo de famílias de indivíduos com TW não relacionado a alterações em 11p13 e 11p15 levaram à identificação de outras regiões cromossômicas relacionadas, como 17q e 19q (Dome e Coppes, 2002; Grundy *et al.*, 2002;

Strong, 2003). Além dessas, outras alterações se mostraram frequentes em indivíduos com TW, entre elas trissomias dos cromossomos 7, 8 e 12, perdas de 1p, 16q, 22q e X, ganho de material dos cromossomos 6, 7p, 7q, 13 e 17p, como também duplicações em 1q (Mertens *et al.*, 1994; Coppes *et al.*, 1999; Valera *et al.*, 2010; Gadd *et al.*, 2012).

Yuan *et al.* (2005) também observaram alterações cromossômicas envolvendo as regiões 11q, 14q e 1p, além de uma região adicional em 4q não perviamente relacionada a TW. Contudo, o ganho de todo o cromossomo 12 foi a mais comum, presente em 44% dos casos, seguido por ganho de 7q e do cromossomo 8, ambos presentes em 28% dos casos. Resultados semelhantes foram encontrados por Sheng *et al.* (1990) que, analisando 31 casos de TW, encontraram a trissomia do cromossomo 12 como a alteração mais frequente, presente em 52% dos tumores analisados.

Grande parte das alterações citogenéticas encontradas em TW tem mostrado associações com o prognóstico, como é o caso do ganho de material de 1q e das perdas cromossômicas em 1p, 11q, 16q e 22q, que parecem estar associadas a uma pior evolução clínica, sendo associadas principalmente à progressão da doença, à recidiva, a pior sobrevida livre de eventos e sobrevida global, sugerindo algum grau de resistência ao tratamento, o que indica um pior prognóstico (Klamt *et al.*, 1998; Wiener *et al.*, 1998; Bown *et al.*, 2002; Dome and Coppes, 2002; Grundy *et al.*, 2002; Stock *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004; Gratias *et al.*, 2013; Segers *et al.*, 2013).

Porém, apesar do grande número de estudos envolvendo o TW e de grande parte das alterações citogenéticas apresentarem alguma correlação com o prognóstico, nenhuma delas mostrou, até o momento, uma especificidade

adequada em uma população numericamente significativa para que possa ser estabelecida como marcador de prognóstico para este tumor. Por este motivo, são necessários estudos mais específicos, direcionados principalmente às alterações gênicas que permitam distinguir os tumores de melhor prognóstico daqueles de pior prognóstico para que seja possível uma maior individualização do tratamento.

No que diz respeito a tumores do SNC, o meduloblastoma é a neoplasia maligna primária mais comum, entretanto o seu comportamento biológico permanece mal compreendido. Estudos em tumores do SNC mostram grande heterogeneidade citogenética, exibindo cariótipos complexos com envolvimento de vários cromossomos, incluindo o 5, 6, 11, 16, 17, e cromossomo sexual (Biegel *et al.*, 1989). Todavia, alteração cromossômica única ou gene supressor específico relacionado ao desenvolvimento do meduloblastoma ainda não foram determinados (Franco *et al.*, 1999; Packer *et al.*, 1999). Dessa forma, novos estudos tem sido necessários para estabelecer uma forte relação entre as alterações relatadas com a origem ou progressão destes tumores.

Em geral, a alteração cromossômica mais frequente em tumores do SNC é o isocromossomo da região 17q, associada à perda de 17p acompanhada por ganho de 17q, com ponto de quebra localizado na região proximal do braço curto, 17p11, cuja formação pode ser responsável pela inativação do gene supressor tumoral *tp53*, com posição distal em 17p, além de outros genes supressores tumorais encontrados nessa região. Essa alteração é observada em 30% a 50% de todos os casos de MB (Franco *et al.*, 1999; Spitz *et al.*, 2003; Aldosari *et al.*, 2000; McCabe *et al.*, 2006; Mendrzyk *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2012).

Entretanto, a importância de 17p ou i(17q) como marcador prognóstico tem sido controversa. Park *et al.* (2012) avaliaram o valor da perda da região 17p (perda de gene supressor) e do ganho 17q (alta expressão de oncogenes MYCC ou MYCN), bem como a importância do ganho 17q na determinação de mau prognóstico. Seus resultados confirmaram que a perda 17p é um importante marcador prognóstico, revelando que não somente o i(17q), mas a perda de 17p é que estava associada a um mau prognóstico. O ganho 17q apenas não mostrou associação estatisticamente significativa com uma menor sobrevida nos pacientes com MB analisados.

Adicionalmente, o ganho das regiões cromossômicas 1q ou 6q também vem sendo correlacionadas com o prognóstico em MB, sendo proposto como um marcador prognóstico negativo, enquanto a perda do cromossomo 6 representa um marcador prognóstico positivo (Lamont *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 2007; Pfister *et al.*, 2009; McCabe *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012). Pezzolo *et al.* (2011) propuseram um novo marcador prognóstico para estratificação de risco de pacientes pediátricos com MB, o qual baseia-se na perda da região 10q26.1-q26.3 associada ao ganho de 17q24.3-q25.3 e/ou 7q34-q36.3, que prediz uma menor taxa de sobrevida. E Coco *et al.* (2011) observaram uma associação significativa entre menor sobrevida em pacientes com MB e perdas nas regiões 9q, 10q e 16q.

Esses dados podem ser importantes para estabelecer uma estratégia para estratificação de risco em MB. Uma avaliação correcta do prognóstico é essencial para a avaliação clínica da malignidade (Sisley, 1998; Park *et al.*, 2012).

Estudos citogenéticos têm apresentado informações detalhadas e relevantes quanto às alterações cromossômicas observadas nos diversos tipos de

câncer, fornecendo *insights* sobre os mecanismos genéticos da tumorigênese e evidências de significado prognóstico para melhor entendimento da doença (Batanian et al., 2002).

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar fatores clínicos, moleculares e citogenéticos em crianças com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma, atendidas no CEONHPE/HUOC/UPE.

3.2 Específicos

1. Avaliar os parâmetros clínicos de pacientes com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma, tais como: procedência, sexo, idade, principais sinais e sintomas, local primário do tumor, metástase, estadiamento, parâmetros laboratoriais relevantes, tratamento e estadio.
2. Investigar o impacto das variáveis clínicas estudadas na sobrevida dos pacientes com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma;
3. Comparar as frequências alélicas e genotípicas para os genes *MTHFR*, *MTR*, *TYMS* e *SLC19A1* em crianças com os tumores embrionários estudados (casos), e em crianças sem malignidade (controle), e identificar se há associação de risco entre a ocorrência de tumores embrionários e os polimorfismos desses genes, avaliando a ocorrência desses polimorfismos

como fatores de susceptibilidade ao desenvolvimento dos tumores estudados e o impacto na sobrevida dos pacientes;

4. Desenvolver as técnicas de cultura de longa duração em tumores sólidos, extração e citogenética molecular de amostras tumorais parafinadas no Laboratório de Citogenética do CEONHPE/HUOC/UPE, e caracterizar citogeneticamente esses tumores.

4. Material e Métodos

4.1. Local, período e desenho do estudo

O estudo foi realizado no Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (CEONHPE/HUOC/UPE) no período de 2010 a 2014.

O CEONHPE consiste de um prédio de 07 andares, dispondo de 36 leitos para internamento e 02 isolamentos reversos, destinados ao tratamento dos pacientes pediátricos com câncer. O serviço realiza aproximadamente 1000 atendimentos ambulatoriais e, em média, 600 quimioterapias por mês. É um dos maiores centros de oncologia pediátrica do norte-nordeste com 200 casos novos/ano.

O CEONHPE foi construído com recursos doados pela sociedade pernambucana e teve o GAC - Grupo de Ajuda a Criança Carente Com Câncer como executor do projeto. O GAC é uma instituição filantrópica, sem fins lucrativos, criada em março de 1997. Como atividade, tem a missão de contribuir para minimizar o sofrimento de crianças e adolescentes com câncer e de seus familiares, através da humanização terapêutica, promovendo a melhoria da qualidade de vida e a sua inserção na sociedade.

O CEONHPE disponibilizou toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho, possuindo arquivo de prontuários de atendimento ambulatorial, internamento e óbito. O Laboratório de Biologia Molecular conta com três ambientes destinados a diferentes processos metodológicos: sala para extração de DNA e RNA, sala de amplificação e eletroforese, sala de Pré-PCR e

cDNA. O Laboratório de Citogenética do CEONHPE possui salas específicas para cultura e processamento celular, como também para análise e cariotipagem.

Todas as drogas e os equipamentos utilizados para o desenvolvimento do trabalho estavam disponíveis nos Laboratórios do CEONHPE.

O desenho do estudo se caracteriza por abordagens retrospectiva e prospectiva, genético-molecular do tipo analítico transversal com comparação de grupos quanto à análise molecular, e descritivo para as análises clínicas e citogenéticas.

4.2 Amostragem e estratégia de seleção dos casos

Os casos foram identificados através de uma busca de prontuários no CEONHPE/HUOC/UPE para confirmação do diagnóstico clínico. Foram analisados 340 pacientes com neuroblastoma (51), retinoblastoma (141), tumor de Wilms (97) e meduloblastoma (51) quanto ao estudo clínico e de sobrevida.

Como caráter retrospectivo, foram recrutados, a partir dos prontuários médicos, todos os casos de crianças de 0 a 19 anos, com tumores embrionários (tumor de Wilms, neuroblastoma, retinoblastoma, meduloblastoma), independentemente da fase de evolução da doença, que estavam sendo acompanhadas no serviço do CEONHPE/HUOC/UPE.

A investigação das amostras de pacientes que foram atendidos no CEONHPE/HUOC/UPE antes do início desse trabalho ou que haviam ido a óbito foram analisadas a partir de material biológico armazenado no Laboratório do CEONHPE/HUOC/UPE.

Como caráter prospectivo, foram incluídos no estudo os pacientes pediátricos recém admitidos no serviço, com idades entre 0 e 19 anos, diagnosticados para os tumores estudados e atendidos no serviço no período do desenvolvimento do projeto.

Como critérios de inclusão, considerou-se crianças (0 a 19 anos) com diagnóstico histológico confirmado, em tratamento ou fora de tratamento, em regime ambulatorial. Foram excluídos os casos com material biológico inadequado ou insuficiente; crianças tratadas para outra doença oncológica; e aqueles que não concordaram em participar do estudo.

Um banco de amostras de DNA de crianças atendidas no serviço de referência em identificação humana da Universidade Federal de Pernambuco foi utilizado para obtenção de amostras controle para estudo molecular. Todos os controles estavam livres de história pessoal de câncer.

4.3 Considerações Éticas

O projeto foi aceito pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC/UPE) - número do protocolo CEP – HUOC/PROCAPE 65/2010; CAAE: 0059.0.106.100-10 (Anexo 1). Pacientes ou responsáveis foram orientados sobre a proposta de estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

4.4 Obtenção dos dados clínicos

Os dados clínicos dos 340 pacientes estudados foram obtidos a partir da análise dos prontuários. Foram analisados os prontuários referentes ao atendimento ambulatorial, internamento e/ou obtidos em arquivo de óbitos do CEONHPE e arquivo geral do HUOC. Os dados observados foram revisados e confirmados pelo médico responsável.

4.5 Coleta do material biológico

Amostras de sangue periférico e tumor fresco foram utilizadas no estudo prospectivo, e amostra tumoral parafinada e DNA armazenados no Laboratório, para estudo retrospectivo.

As amostras de sangue periférico foram obtidas através de punção venosa à vácuo em tubos contendo EDTA (*BD Vacutainer, Preanalytical Solutions, Franklin Lakes, NJ*), solicitadas através do médico em consultas de rotina ambulatorial ou durante o procedimento cirúrgico. Essa amostra foi utilizada para estudo molecular, através da extração de DNA e identificação de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo do folato.

As amostras de tumor fresco foram obtidas a partir de ressecção cirúrgica ou biópsia por agulha. A amostra de tumor fresco foi utilizada em cultura de tecidos e estudo citogenético clássico e molecular, bem como estudo molecular.

As amostras tumorais armazenadas em parafina foram obtidas no Centro Integrado de Anatomia Patológica (CIAP/HUOC) e no CEONHPE/HUOC/UPE.

Tais amostras foram utilizadas no estudo citogenético molecular e no estudo dos polimorfismos da rota metabólica do folato,

A coleta do material biológico foi iniciada após consentimento da pessoa responsável ou após autorização do CEONHPE/HUOC e CIAP/HUOC.

4.6 Análise Molecular

4.6.1 Extração de DNA de sangue periférico

O DNA genômico foi isolado de leucócitos periféricos pelo método de *Salting Out* (Miller, 1988). Inicialmente, foi realizada a lise de membrana, onde em um microtubo de 2mL, foi adicionado 300µL de sangue total e 1mL de tampão de lise celular, permanecendo por 10 minutos sob reação a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 13.000 rpm por 4 minutos. A etapa foi repetida duas vezes, para promover a completa degradação da membrana plasmática e limpeza do material. O passo seguinte foi a lise de núcleo, proporcionada pela solução de lise nuclear (200µL) e SDS a 10% (50µL), e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, uma nova adição do tampão de lise de núcleo (150µL) foi realizada, seguindo de homogeneização vigorosa em agitador magnético e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a digestão das proteínas com 10 µL de proteinase K (20mg/mL) e incubação por 2h a 65°C. Foi realizada a precipitação das proteínas através da adição de 175µL de solução de NaCl a 5,3M, e centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. O DNA presente no sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 1mL de etanol

absoluto para precipitação do mesmo, permitindo sua visualização após a agitação do tubo. A amostra foi submetida à centrifugação de 13.000 rpm por 10 minutos para formação do precipitado de DNA. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e, em microtubo de 1,5 ou 2,0 mL, foi adicionado 1mL de etanol a 70%. Antes da última centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos, foi procedida uma homogeneização em agitador magnético. Foi realizada a secagem do DNA e adição de solução de Tris EDTA, pH 8 para hidratação.

4.6.2 Extração de DNA de tumor sólido a fresco

O DNA genômico foi isolado de tumor sólido pelo método adaptado de *Salting Out* (Miller, 1988). Inicialmente, o tumor foi macerado com uma lâmina de bisturi; adicionando-o em um microtubo de 1,5 mL. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão de lise de membrana e 30 µL de proteinase K (20mg/mL), seguindo para incubação a 65° C (*overnight*). O microtubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material foi homogeneizado em agitador magnético. O passo seguinte foi a lise de núcleo, proporcionada pela solução de lise nuclear (250µL), SDS a 10% (50µL) proteinase K 20mg/mL (20µL), e incubação a 65° C (*overnight*). Posteriormente, foi realizada a precipitação das proteínas através da adição de 200µL de solução de NaCl a 5,3M, e centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. O DNA presente no sobrenadante foi transferido para outro tubo (2 mL), onde foi adicionado 1mL de isopropanol, seguindo de homogeneização por inversão. A amostra foi submetida à centrifugação de 13.000 rpm por 10 minutos para formação do precipitado de DNA. Logo após, o sobrenadante foi descartado e, no microtubo,

foi adicionado 1,5 mL de etanol a 100%. Em seguida procedeu-se a centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e adicionado 1 mL de etanol 70%. Antes da última centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos, foi realizada uma homogeneização em agitador magnético. O sobrenadante foi novamente descartado, para, em seguida, ser adicionado 100µL de solução de reidratação (Tris EDTA, pH 8).

4.6.3 Extração de DNA a partir de tecido tumoral parafinado

A extração de DNA foi realizada utilizando o *Kit QIAamp® DNA FFPE tissue QUIAGEN®*. Inicialmente, as amostras foram obtidas a partir de cortes dos blocos de parafina em micrótomo (3 a 8 cortes de 10µm por caso). Quando a superfície da amostra no bloco de parafina esteve disposta ao ar, foram descartadas as 3 primeiras seções. Os cortes foram colocados em tubo de 1,5mL ou 2,0mL. Foi adicionado 1mL de xilol e realizada uma homogeneização vigorosa por 10 segundos em agitador magnético. Os tubos foram centrifugados em máxima velocidade (13.000 rpm) por 2 minutos em temperatura ambiente (TA). Em seguida, o sobrenadante foi removido com pipeta. Foi adicionado 1mL de etanol (96-100%) ao precipitado de DNA e misturado em agitador magnético para extrair o xilol da amostra. Os tubos foram homogeneizados e submetidos à centrifugação à 13.000 rpm por 2 minutos em TA. O sobrenadante foi removido. Os tubos foram abertos e mantidos em TA, ou a 37°C por 10 minutos, ou ainda até evaporar o etanol residual. O precipitado foi ressuspensionado em 180µL de tampão. Foram adicionados 20µL de proteinase K (20mg/mL) e, em seguida, os tubos foram homogeneizados em agitador magnético e incubados a 56°C por 1

hora, ou até a amostra ser completamente lisada. Logo após, foram incubados a 90°C em tampão para reverter parcialmente a modificação do formaldeído dos ácidos nucleicos. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação rápida para retirar as gotas da tampa. Logo após, foram adicionados 200µL de tampão, seguindo de homogeneização em agitador magnético. Foram adicionados 200µL de etanol 100% e novamente homogeneizado em agitador magnético. Os tubos foram centrifugados rapidamente para retirar as gotas da tampa. Cuidadosamente, o lisado foi transferido para uma coluna em tubo de 2mL, sem molhar a borda do tubo. Os tubos foram submetidos à centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi retirada e transferida para outro tubo de 2mL. Cuidadosamente, foram adicionados 500µL de tampão sem molhar a borda do tubo. Foi repetida a etapa de centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto e a coluna foi novamente transferida para outro tubo de 2mL. Cuidadosamente, foram adicionados 500µL de tampão e novamente centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi transferida para outro tubo de 2mL. Os tubos foram submetidos à centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5mL. Cuidadosamente, foram adicionados de 20 a 100µL de tampão e os tubos foram incubados à temperatura ambiente de 1 a 5 minutos. Foram submetidos à centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto e o DNA extraído armazenado à -20°C.

4.6.4 Quantificação do DNA

O DNA extraído foi quantificado em NanoDrop 2000 (Thermo® Scientific). A sua qualidade foi observada em corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8% e documentada em sistema de fotodocumentação L-PIX EX Versão 1.0 Loccus Biotecnologia/Nº H176/2012.

4.6.5 Identificação dos Polimorfismos

Os polimorfismos *MTHFR* C677T foram avaliados por PCR-RFLP (Frosst, 1995) e A1298C por PCR-ASA (Biseli *et al.*, 2009), respectivamente. O polimorfismo no gene *SLC19A1* foi identificado através de PCR-RFLP (Chango *et al.*, 2000), assim como o polimorfismo *MTR* (Matsuo, 2001). As repetições em tandem *TYMS*, identificados por PCR (Hishida, 2003).

4.6.5.1 Determinação dos polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C

A amplificação do DNA foi realizada utilizando 13,2µL de H₂O, 2,5µL de tampão a 1,5mM, 1µL de MgCl₂ a 50mmol, 2µL de dNTP a 200µmol, 3,0µL de *primers* a 10 pmoles (direto e reverso) e 0,2µL de Taq DNA polimerase a 5U/µL. A concentração de DNA genômico para a reação foi de 50 a 200ng/µL.

Os *primers* utilizados para genotipagem do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* foram: (direto) 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' e (reverso) 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'. O programa de amplificação consistiu em um ciclo de 95°C por 6 minutos e 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 62,5°C por 1

minuto e 30 segundos, 72°C por 1 minuto, seguido de um ciclo a 72°C por 7 minutos. O produto amplificado foi digerido pela enzima de restrição *Hinf I* 2U/μL (0,3 μL da enzima e 1,0 μL de seu respectivo tampão), após permanência em banho-maria a 37°C por 48 horas (Frosst *et al.*, 1995).

A genotipagem do polimorfismo A1298C da MTHFR, foi realizada pelo método de PCR alelo específico e foram utilizados os *primers* (direto) 5'- GGA GCT GAC CAG TGA AGA -3' e (reverso) 5'- TGT GAC CAT TCC GGT TTG -3 para amplificação do alelo A (5 pmoles); e os *primers* (direto) 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA -3 e (reverso) 5'- AAG ACT TCA AAG ACA CTT G - 3' para amplificar o alelo C (5 pmoles). O controle interno da reação foi do gene *Cyp 46* e foram utilizados os seguintes *primers* 5'-TGA AAA CGA GTT TCC CGT CC-3' (0,3 pmoles) e 5'-GTG TGA CCA GGT AAC AGT CA-3' (0,3 pmoles). A reação de PCR teve um volume final de 25 μL com 1,5U de Taq polimerase, 0,2mM de DNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 3 μL de DNA. O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos seguidos por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 50 segundos para extensão da cadeia (Biselli *et al.*, 2009 adaptado).

Em seguida, os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% em solução tampão de Tris-acetato a 40 mmol com EDTA a 1mmol, corados por brometo de etídio a 0,5μg/ml, submetidos à diferença de potencial de 100 v por 50 minutos e visualizados em transiluminador de ultravioleta (Ultralum).

4.6.5.2 Determinação do polimorfismo *SLC19A1* G80A

A PCR do DNA genômico foi realizada no volume total de 24µL, contendo 14µL de H₂O milliQ autoclavada, 2,5µL de PCR Buffer (10X) [50 mM kCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)], 1µL de MgCl₂ a 50mmol, 2µL de DNTP a 200µmol, 1,5µL de *primer forward* (5'-AGT GTC ACC TTC GTC CCC TC-3') e *reverse* (5'-CTC CCG CGT GAA GTT CTT-3'), 1,3µL de DMSO (dimetilsufóxido) e 0,2µL da enzima DNA Taq Polimerase (Invitrogen) a 5U/µL, por amostra. As condições dos ciclos térmicos foram: 2 minutos a 94°C, seguido por 37 ciclos de 94°C por 30 segundos (para desnaturação da dupla fita de DNA), 60°C por 30 segundos (para o pareamento dos *primers*), 72°C por 45 segundos (para extensão da cadeia nascente de DNA) e uma extensão final de 7 minutos a 72°C (Chango, *et al.*, 2000).

Posteriormente, os produtos amplificados foram digeridos pela endonuclease de restrição *HhaI* em uma reação contendo todo o produto amplificado, 2,5 µL do Buffer *HhaI* e 0,3 µL de *HhaI* 2U/µL, a 30°C por 48 horas. O produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose 3% em solução tampão de Tris-acetato a 40 mmol com EDTA a 1mmol, corados por brometo de etídio a 0,5µg/ml, submetidos à diferença de potencial de 100 v por 50 minutos e visualizados em transiluminador de ultravioleta (Ultralum). Os fragmentos resultantes da digestão foram de 125, 62 e 37pb para o alelo G e de 162 e 62pb para o alelo A.

4.6.5.3 Determinação do polimorfismo *TYMS*

A genotipagem foi realizada por PCR utilizando 16,8µL de água, 2,5µL de tampão, 0,75µL de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µL de dNTPs (10mM), 1,25µL de DMSO, 1,0µL de *primers* (forward) 5'-CGT GGC TCC TGC GTT TCC-3' e (reverse) 5'-GAG CCG GCC ACA GGC AT-3' (10pmol) e 0,2µL de *Taq polimerase*, com o volume total de 24µL, sem a amostra de DNA. A quantificação de DNA genômico para a reação foi de 200ng/µL, podendo o volume variar para se adequar ao valor ideal. A amplificação foi realizada em ciclos térmicos de 94°C por 5 minutos e 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e um ciclo de 72°C por 7 minutos (Hishida, 2003).

Os produtos da amplificação foram separados, eletroforeticamente, em gel de agarose 3%, usando solução tampão de Tris-Borato a 40 mmol com EDTA a 1mmol, corados por brometo de etídio a 0.5µg/ml e visualizados em transiluminador de ultravioleta (Ultralum).

4.6.5.4 Determinação do polimorfismo *MTR A2756G*

Para a genotipagem do polimorfismo *MTR A2756G*, foram utilizados os *primers* (direto) 5'-TGT TCC CAG CTG TTA GAT GAA AAT C-3' e (reverso) 5'-GAT CCAAAG CCT TTT ACA CTC CTC-3'. O programa de amplificação consistiu de um ciclo de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo de 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram digeridos pela enzima de restrição *HaeIII* 2U/µL (0,3 µL da

enzima e 1,0 µL de seu respectivo tampão na concentração de 10X), depois de 48 horas em banho-maria a 37°C (Matsuo, 2001).

O produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose 3% em solução tampão de Tris-acetato a 40 mmol com EDTA a 1mmol, corados por brometo de etídio a 0.5µg/ml, submetidos à diferença de potencial de 100 v por 50 minutos e visualizados em transiluminador de ultravioleta (Ultralum). Os fragmentos resultantes da digestão foram de 211 pb para o alelo A e de 131 e 80 pb para o alelo G. Heterozigotos produzirão bandas para cada alelo, A e G.

4.7 Análise Citogenética Convencional

4.7.1 Protocolo de Incubação de Células de Tecido Tumoral

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de cultura de longa duração de amostras de tumor sólido fresco e processados segundo Gibas (1984), adaptado conforme protocolo a seguir. Inicialmente, a amostra de tumor foi lavada com PBS e fragmentada. Foi adicionado 1 mL de collagenase e, em seguida, o material foi incubado a 37°C 5% CO₂ por 10 a 30 minutos. A collagenase foi inativada com 500 µL de SBF. O material foi transferido para um tubo e 6 mL de PBS foi adicionado, sendo homogeneizado. O sobrenadante foi transferido para um segundo tubo. Foram adicionados 6 mL de PBS no primeiro tubo. Os dois tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos a TA (~22°C). Os sobrenadantes de ambos os tubos foram desprezados. Em seguida, foi adicionado 6 mL de PBS no primeiro tubo, seguindo de homogeneização. O sobrenadante foi transferido para o segundo tubo, mantendo os fragmentos

maiores no primeiro tubo, que foi então desprezado. O segundo tubo foi homogeneizado e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos em TA. Após a centrifugação, o máximo de sobrenadante foi desprezado. O Meio Completo DMEM + 10% SBF (2 mL/garrafa) foi preparado e adicionado ao segundo tubo. O material do segundo tubo (2 mL) foi transferido para uma garrafa. Em seguida, a garrafa foi analisada em microscópio de inversão, para verificar a quantidade e qualidade do material a ser incubado e, posteriormente, foi levada para a incubadora a 37°C 5% CO₂, por aproximadamente 15 dias.

4.7.2 Sincronização da Cultura Celular

Após o tempo de cultura, o sobrenadante do material foi aspirado e desprezado. Foram adicionados 1,5 mL de PBS e logo retirados delicadamente. Foram adicionados 3 mL de Meio Completo DMEM + 2% SBF à cultura, que foi levada imediatamente à incubadora 37°C, 5% CO₂ por 24 horas. Após as 24 horas, o Meio Completo DMEM + 2% SBF contido na cultura foi substituído por Meio DMEM + 10% SBF. Ao final do mesmo dia foram adicionados 10 µL de Colcemid (10µg/mL - GIBCO) para cada 2 mL de Meio Completo. O Colcemid permaneceu em cultura por exatamente 16 horas.

4.7.3 Processamento da Cultura

Após as 16 horas em Colcemid, o sobrenadante da cultura celular foi desprezado. Foram adicionados 1,5 mL de PBS para lavagem do material e, em seguida, foi adicionado 1 mL de tripsina. O material foi incubado a 37°C e 5% CO₂

por 5 minutos. A cultura foi analisada quanto à ação da tripsina a cada 5 minutos. Após o tempo necessário em tripsina para soltar as células aderidas, foi adicionado Meio Completo DMEM + 10% SBF para inativar a enzima. O material foi transferido para um tubo e submetido à centrifugação por 10 minutos a 100 rcf em TA (~22°C). O sobrenadante foi despresado e adicionado 5 mL de PBS, seguindo para centrifugação a 1200 rpm por 6 minutos em TA. Logo após, foi realizada a hipotonia, adicionando 10 mL de KCl 0,75M a 37°C por 15 minutos, e fixação em 0,5 mL de 3:1 Metanol - Ác. Acético. O tubo foi submetido à centrifugação a 1200 rpm por 6 minutos em TA. O sobrenadante foi desprezado e acrescentado 5 mL de Fixador, homogeneizando em agitador magnético. O material foi submetido à centrifugação a 1200 rpm por 6 minutos em TA. A lavagem foi repetida 2X, de acordo com o método descrito por Chauffaille (2001).

4.7.4 Preparação das lâminas para análise

Após o processamento da cultura, as lâminas foram preparadas utilizando o precipitado obtido após centrifugação e descarte do sobrenadante. O material foi gotejado na lâmina, que, por sua vez, foi analisada no microscópio em contraste de fase para verificar a presença de metáfases. Foi realizado o bandeamento G em Giemsa e Tampão Fosfato, segundo Seabright (1971), com modificações, quando metáfases foram observadas. Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN) 2005, em seguida foram documentados (Cytovision – Applied Imaging).

4.8 Análise Citogenética Molecular

4.8.1 Preparação das lâminas

Os blocos de parafina contendo amostra de tecido tumoral foram obtidos no CIAP/HUOC e no CEOHNPE/HUOC/UPE, em seguida cortados utilizando micrótomo rotativo manual EP-31-20091 EasyPath. Três lâminas foram preparadas por bloco, cada uma contendo dois a três cortes fixados.

4.8.2 Extração de tecido tumoral armazenado em parafina

A extração de tecido tumoral armazenado em parafina foi realizada segundo Liehr (2009). Inicialmente, a parafina foi removida colocando as lâminas em xilol por 5 minutos, por duas vezes consecutivas. Em seguida, as lâminas foram submetidas à concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70% e 50%) por um período de 3 minutos cada. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em solução de NaCl 0,9% por 2 minutos, por duas vezes, e os tecidos indesejados foram removidos com bisturi. Para digestão do tecido foram adicionados 300µL de proteinase K nas lâminas, as quais foram colocadas em câmara úmida por 1h a 37 °C. A solução da lâmina foi aspirada com pipeta e filtrada em gaze de nylon (55µm). Em seguida, a gaze foi lavada com 4 mL de PBS 1X. O material foi submetido à centrifugação a 800 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionados 300 µL de PBS para ressuspender o precipitado. A suspensão foi gotejada na lâmina. A lâmina permaneceu em câmara seca a 25°C por 20 horas. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de

solução de Formalina/PBS 1X 2% e colocada a lamínula (24x60 mm), permanecendo por 10 minutos. Em seguida, a lamínula foi retirada e a lâmina foi imersa em solução de PBS 1X por 5 minutos. Posteriormente, a lâmina foi lavada em H₂O destilada por 1 minuto e submetida à concentrações crescentes de etanol (75%, 95% e 100%), por 3 minutos. Esta lâmina foi analisada em contraste de fase em microscópio Olympus para marcação dos pontos contendo material mais adequado para análise. Em seguida, foram realizadas as etapas de tratamento com pepsina, desnaturação e hibridização.

4.8.3 Hibridização *In Situ* Fluorescente – FISH

4.8.3.1 Sondas utilizadas

A técnica de FISH foi realizada utilizando sondas loco-específicas comerciais *RB1 Deletion Probe (Aquarius)*, para os casos de Retinoblastoma, e *LSI N-MYC Spectrum Orange (Vysis)*, para os casos de Neuroblastoma. Sondas para as regiões 11p13 (*BAC RP11-38L8-2.861-2.863*) e 11p15 (*BAC RP11-804L22-31.767-32.467*), produzidas no Instituto de Genética Humana da Universidade de Jena, Alemanha, foram utilizadas para estudo dos casos de tumor de Wilms. A FISH foi realizada seguindo protocolo do fabricante.

4.8.3.2 Pré tratamento com Pepsina

A lâmina foi desidratada com álcool nas concentrações de 70%, 90% e 100%, permanecendo por 3 minutos em cada. A solução de HCl 1N (47,5mL de

água Mili-Q + 2,5mL de HCl 1N) foi preparada, e colocada no banho a 37°C. Foram adicionados 250uL de Pepsina em solução de HCl, quando a solução atingiu 37°C. Após adicionar a pepsina, a lâmina foi colocada na solução por 5 minutos. Em seguida, a lâmina foi colocada no PBS por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 100 uL de pósfix na lamínula grande e depois a lâmina foi sobreposta à lamínula, permanecendo por 10 minutos em temperatura ambiente. Após os 10 minutos, a lamínula foi retirada e a lâmina colocada no PBS por 5 minutos. Em seguida, a lâmina foi desidratada no álcool 70%, 90% e 100% por 3 minutos cada, permanecendo em temperatura ambiente até secar.

4.8.3.3 Hibridização em amostras de retinoblastoma e neuroblastoma

Desnaturação da lâmina e Hibridização: A sonda *n-myc* (Vysis) foi preparada adicionando 1uL de H₂O + 3,5uL Tampão + 0,5uL sonda, para hibridização de amostras de neuroblastoma. Foi utilizada sonda comercial *RB1* (Aquarius) de pronto uso para hibridização de amostras de retinoblastoma. As sondas foram, então, homogeneizadas, centrifugadas, sob proteção da luz, e aplicadas na região marcada. A lamínula foi sobreposta à lâmina e selada. A lâmina e a sonda foram desnaturadas a 72°C por 3 minutos. E, após os 3 minutos, a lâmina foi colocada em câmara úmida e mantida a 37°C por 48 horas.

4.8.3.4 Hibridização em amostras de tumor de Wilms

Desnaturação das lâminas: Foram adicionados 100 µL de Formamida 70% à lâmina e sobreposta uma lamínula, seguindo para desnaturação por 3 minutos em

placa aquecida a 72-73°C. Passados os 3 minutos, a lamínula foi removida imediatamente. A lâmina foi imersa em etanol 70% (-20°C) por 3 minutos, com posterior desidratação em álcool 95% e 100% por 3 minutos, sendo mantida à temperatura ambiente para secar.

Desnaturação da Sonda e Hibridização: As sondas para as regiões 11p13 (BAC RP11-38L8-2.861-2.863) e 11p15 (BAC RP11-804L22-31.767-32.467) foram centrifugadas brevemente e, em seguida, homogeneizadas em agitador magnético, sendo novamente submetidas à centrifugação. Posteriormente, as sondas foram aliquotadas em igual volume (1:1), homogeneizadas em agitador magnético e submetidas à breve centrifugação. A desnaturação das sondas foi realizada em termociclador às temperaturas 75°C por 5 minutos, 4°C por 2 minutos e 37°C por 45 minutos. Foram adicionados à lâmina, contendo material já desnaturado inicialmente, 10 µL da solução v/v de sonda desnaturada. Em seguida, foi adicionada uma lamínula 24x24 mm², cujas bordas foram seladas com cola. Em seguida, a lâmina foi colocada em câmara úmida e mantida em estufa 37°C por 48 horas.

4.8.3.5 Lavagem pós hibridização e preparação para análise

A lâmina foi retirada da câmara úmida e, cuidadosamente, a lamínula foi removida. A lâmina foi imersa em uma solução de 1X SSC e mantida em banho maria à 62°-65°C por 5 minutos. Após os 5 minutos, a lâmina foi colocada em solução de 4X SSC + Igepal, permanecendo em agitação por 5 minutos, e posteriormente imersa em PBS por 5 minutos. O PBS foi desprezado e a lâmina lavada duas vezes consecutivas com H₂O Mili-Q e, em seguida, desnaturada em

álcool 70%, 90% e 100% por 3 minutos cada. Por fim, cerca de 8 µL de DAPI foi adicionado ao material. Após 24 horas os núcleos interfásicos foram analisados e documentados (Cytovision – Applied Imaging).

4.9 Análise dos dados

A análise dos dados moleculares foi realizada utilizando o programa BioEstat 5.0.

As frequências alélicas e genóticas observadas foram analisadas por contagem gênica. O teste do Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para verificar se as frequências genóticas observadas e esperadas estavam de acordo com a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em seguida, o Teste-G de Williams e o Teste Exato de Fisher foram utilizados para verificar a existência de associações entre os polimorfismos estudados e os tumores embrionários. A hipótese nula foi aceita caso não houvesse diferenças estatisticamente significantes ao nível de $p=0,05$ entre as distribuições genóticas de casos e controles. Contrariamente, a hipótese alternativa foi aceita caso houvesse diferenças estatisticamente significantes entre as distribuições genóticas entre casos e controles. Apenas resultados cujos valores obtidos de p foram menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Quando $p < 0,05$ para o Teste-G de Williams e o Teste Exato de Fisher, foi possível calcular a estimativa de risco através do teste de *Odds Ratio* (OR), utilizando intervalo de confiança de 95% para os parâmetros, permitindo

determinar a influência de cada polimorfismo sobre o risco de desenvolver o respectivo tumor embrionário.

As análises de sobrevida foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*, através da análise de Kaplan-Meier e o teste de Log Rank (Mantel-Cox), para avaliar a significância entre as curvas de sobrevida. A sobrevida dos pacientes foi estimada considerando o intervalo de tempo que compreende da data de diagnóstico até a data da última consulta ou a data do óbito.

Foi realizada a análise descritiva dos resultados citogenéticos. Os dados foram analisados por microscopia e a frequência das alterações foi calculada por contagem direta.

5. Resultados

5.1 Resultados Clínicos e Análise da Sobrevida

A avaliação dos dados clínicos e análise da sobrevida foi realizada em um total de 340 pacientes com Neuroblastoma (51 pacientes – 15%), Retinoblastoma (141 pacientes – 41,47%), Tumor de Wilms (97 pacientes – 28,53%) e Meduloblastoma (51 pacientes – 15%) (Anexo 3).

5.1.1 Neuroblastoma

Foram avaliados 51 pacientes com NB (Tabela 7), sendo a maioria (58,82%) deles procedente do interior de Pernambuco e 33,33% da região metropolitana, os demais eram originários de outros estados. A sobrevida média global dos pacientes foi de 41,90% em 252 meses (Figura 10A).

Tabela 7: Características clínicas dos pacientes com Neuroblastoma.

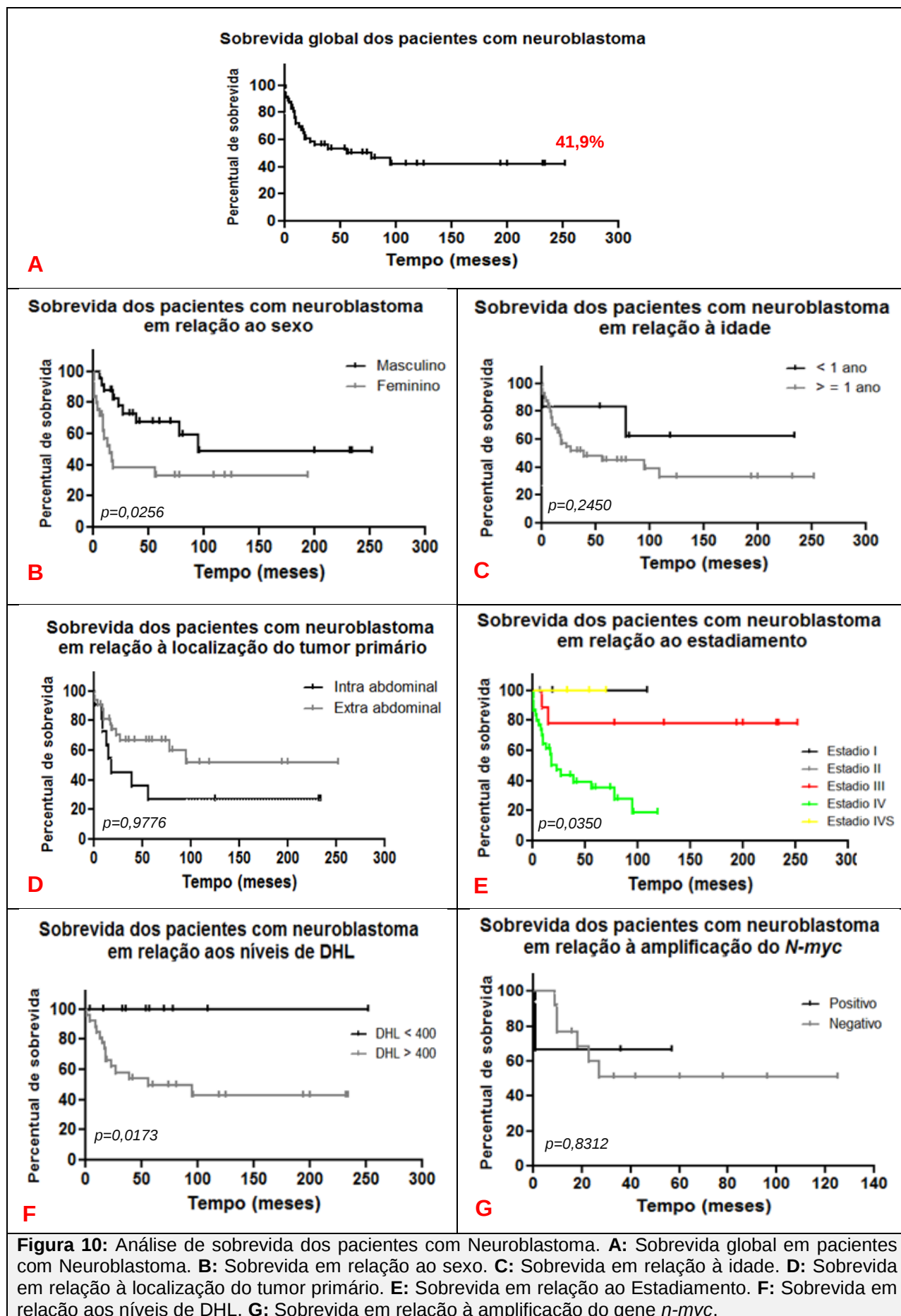
Neuroblastoma		Casos (n=51)
Sexo	Masculino	25 (49,02%)
	Feminino	26 (50,98%)
Mediana de Idade	Masculino	37 meses
	Feminino	52 meses
Status	Feminino	26,5 meses
	Vivos	24 (47,06%)
	Óbitos	24 (47,06%)
	Perda de seguimento	03 (5,88%)
Estadiamento	I	02 (3,92%)
	II	01 (1,96%)
	III	10 (19,61%)
	IV	31 (60,78%)
	IV S	04 (7,84%)
	Não relatados	03 (5,88%)
DHL	>400	29 (56,86%)
	≤400	11 (21,57%)
	Não Relatado	11 (21,57%)
Idade	≥ 1 ano	44 (86,27%)
	< 1 ano	07 (13,73%)

Entre os pacientes com neuroblastoma 49,02% eram do sexo masculino e 50,98% do sexo feminino. A análise da sobrevida em relação ao gênero e ao desenvolvimento da doença evidenciou que o sexo masculino apresentou uma taxa de sobrevida de 49,23% em 252 meses, enquanto o sexo feminino de 33,49% em 194 meses, sendo significativamente menor que o sexo oposto ($p=0,0256$) (Figura 10B).

A idade média entre eles foi de 48,55 meses (4 anos), o paciente mais jovem apresentou um mês e o mais velho 202 meses ao diagnóstico. A mediana da idade dos pacientes foi de 37 meses. Sete pacientes (13,73%) eram menores de um ano de idade. Entre os que apresentaram idade menor que um ano, apenas 3,92% foram a óbito. Os pacientes com idade inferior a um ano apresentaram sobrevida maior (62,5% em 234 meses) quando comparados com os que apresentavam idades maiores de um ano (32,82% em 252 meses), porém não houve relevância estatística ($p=0,2450$) (Figura 10C).

Entre os principais sinais e sintomas, tumores visíveis ou palpáveis estavam presentes entre as queixas de 33,33% dos pacientes, dor abdominal em 31,37%, febre em 27,45%, 21,57% referiram aumento do volume abdominal, 19,61% apresentaram perda de peso e 7,8% alterações no ritmo intestinal, entre outros sinais observados em pacientes com NB.

A localização abdominal do tumor primário foi vista em 66,67% e a extra-abdominal em 33,33%. Os pacientes que apresentaram tumor primário localizado na região abdominal mostraram uma sobrevida inferior (43,75% em 252 meses) aos demais casos (57,14% em 194 meses) com localização extra-abdominal, entretanto, não foi estatisticamente significante ($p = 0,9776$) (Figura 10D).



O estadio IV foi identificado em 60,78% pacientes, o IVS em 7,84%, o III em 19,61%, o II em 1,96%, e o I em 3,92% dos pacientes. Em 5,88% dos pacientes o estadiamento não foi relatado no prontuário. Observou-se uma sobrevida de 18,71% (119 meses) no estágio IV; de 77,77% (252 meses) no estágio III; e de 100% nos estádios I, II e IVS, após 109, 7 e 70 meses, respectivamente ($p=0,0350$) (Figura 10E).

Foram informados valores de DHL em 40 prontuários, e estes estavam elevados (valor de referência (Wallendal *et al.*,1996): < 400 UI) em 29 casos (72,50%) (Tabela 6). Os pacientes com $DHL \geq 400$ UI apresentaram sobrevida significativamente menor (43,19% em 232 meses) em relação àqueles com $DHL < 400$ UI (100% em 252 meses), $p = 0,0173$ (Figura 10F). Outro parâmetro laboratorial avaliado foi a amplificação do gene *n-myc*, sendo 83,33% dos casos estudados negativos para a amplificação desse gene e 16,67% apresentaram resultado positivo. Pacientes com *n-myc* positivo apresentaram taxa de sobrevida de 66,67% em 57 meses e com *n-myc* negativo 51,28% em 125 meses, não sendo observada associação significativa ($p = 0,8312$) (Figura 10G).

O tratamento foi baseado em sessões de quimioterapia, radioterapia e cirurgia conforme protocolos adotados no CEONHPE/HUOC/UPE.

5.1.2 Retinoblastoma

Foram analisados 141 pacientes (Tabela 8) a partir dos prontuários médicos. A maioria (49,67%) era procedente do interior de Pernambuco, 28,10% foram da região metropolitana e os demais eram procedentes de outros estados.

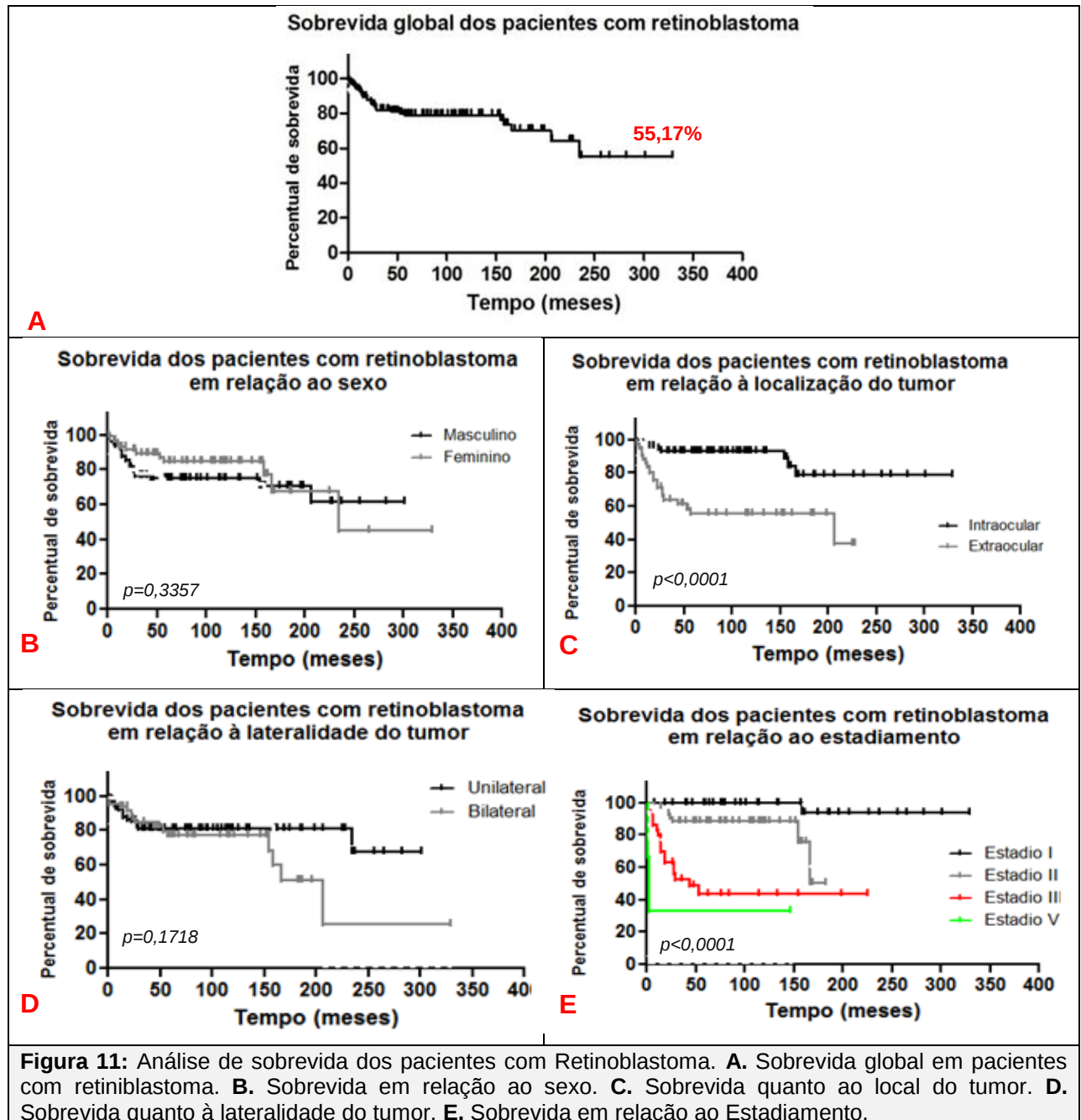
A sobrevida média global entre os pacientes com essa malignidade foi de 55,17% em 329 meses (Figura 11A).

Tabela 8: Características clínicas dos pacientes com Retinoblastoma.

Retinoblastoma		Casos n= (141)
Sexo		
	Masculino	72 (51,06%)
	Feminino	69 (48,94%)
Mediana de Idade		24 meses
	Masculino	27 meses
	Feminino	22 meses
Status		
	Vivos	97 (68,80%)
	Óbitos	33 (23,40%)
	Perda de seguimento	06 (4,25%)
	Não Relatados	05 (3,55%)
Lateralidade		
	Unilateral	86 (60,99%)
	Bilateral	50 (35,46%)
	Não Relatado	05 (3,55%)
Localização		
	Intra Ocular	84 (59,57%)
	Extra Ocular	48 (34,04%)
	Não Relatado	09 (6,38%)
Estadiamento		
	I	44 (31,21%)
	II	51 (36,17%)
	III	35 (24,82%)
	IV	03 (2,13%)
	Não Relatado	08 (5,67%)

Dos pacientes analisados, 51,06% eram do sexo masculino e 48,94% do sexo feminino. A análise da sobrevida em relação ao gênero revelou taxa de sobrevivência de 61,81% (301 meses) para o sexo masculino e 45,03% (329 meses) para o sexo feminino (Figura 11B). Os pacientes com retinoblastoma

foram diagnosticados com idades entre um mês e doze anos, com idade média de 29,26 meses (2,5 anos), variando de um mês a 155 meses, e mediana de 24 meses.



Os principais sinais e sintomas clínicos observados foi diminuição da visão, leucocoria, perda de peso, febre, dor, aumento do globo ocular e proptose. A doença se manifestou de forma unilateral em 60,99% pacientes e na forma

bilateral em 35,46%, sendo intraocular em 59,57% pacientes e extraocular em 34,04% pacientes, nos demais não foi relatado. Infiltração da doença no nervo óptico foi observada em 29,79% pacientes, metástases no sistema nervoso central estavam presentes em 4,96% pacientes e infiltrações na medula óssea foram detectadas em 1,42% dos pacientes estudados. Os pacientes com doença unilateral (67,71%, 301 meses) e intraocular (79,85%, 329 meses) apresentaram melhor sobrevida quando comparados aos que apresentavam bilateralidade (25,73%, 329 meses) e doença extraocular (42,72%, 225 meses) (Figura 11C/D).

O estadio II foi o mais observado entre os pacientes com retinoblastoma (36,17%), seguido do estadio I (31,21%) e do estadio III (24,82%). O estadio IV foi visto em apenas 2,13% dos casos estudados, e 5,67% do total de casos não tiveram o seu estadiamento relatado. A melhor sobrevida foi observada em pacientes com o estágio I (94,11%, 329 meses), seguidos daqueles em estágio II (58,36%, 183 meses) em estadio III (45,68%, 225 meses) e em estágio IV (33,33%, 146 meses), sendo estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Figura 11E).

Os pacientes com retinoblastoma foram tratados com quimioterapia e cirurgia. Em 84,39% dos pacientes foi realizada a enucleação, considerando os pacientes com tratamento relatado, 68,09% estão vivos sem a doença, 0,71% pacientes estão vivos com a doença e 24,11% pacientes foram a óbito.

5.1.3 Tumor de Wilms

Dados clínicos de 97 pacientes (Tabela 9) foram obtidos dos prontuários médicos. Os pacientes oriundos do interior de Pernambuco e região metropolitana do estado representam 44,58% e 39,76% das crianças com tumor de Wilms,

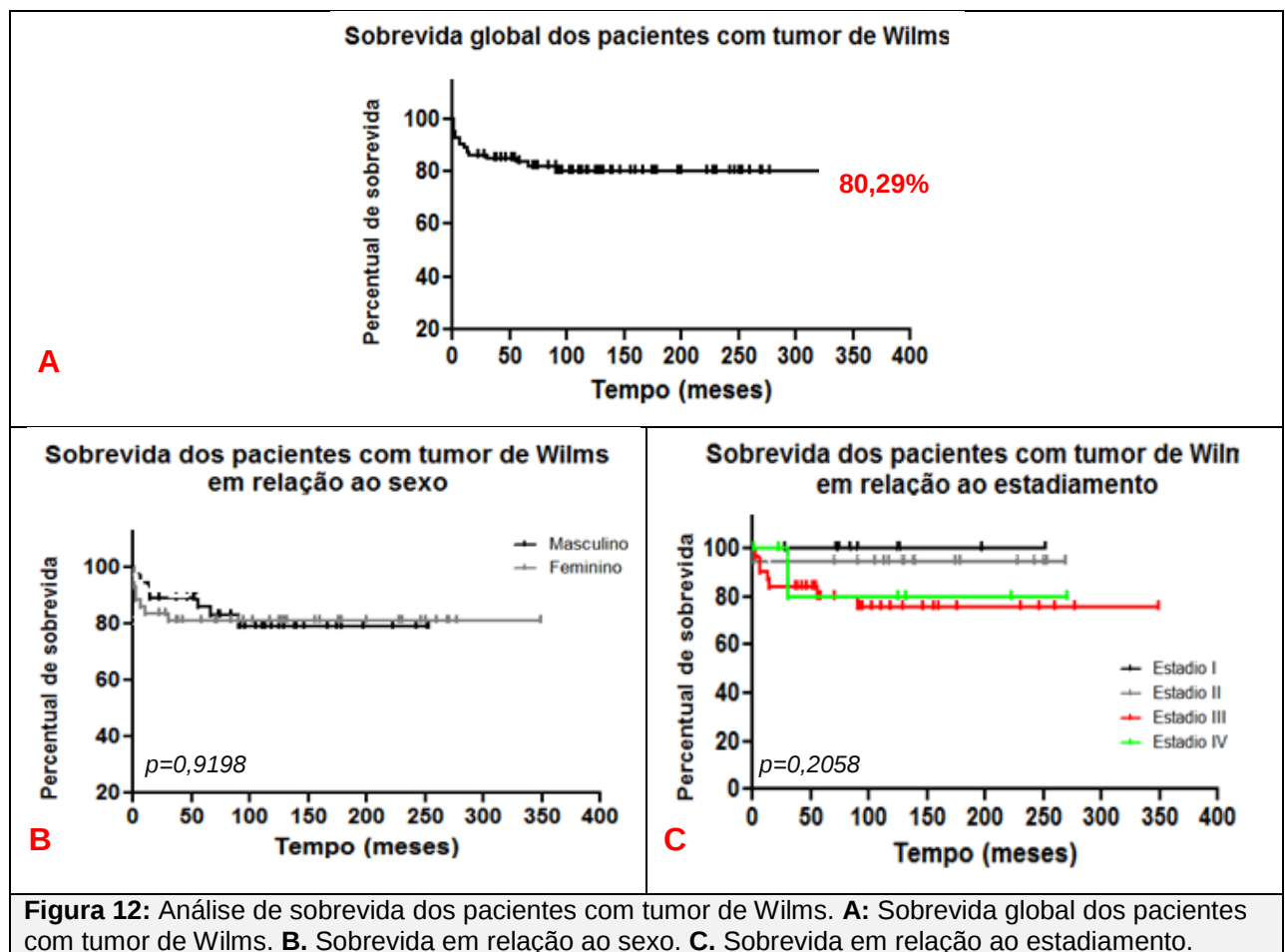
respectivamente. As demais são provenientes de outros estados como Paraíba, Rio Grande do Norte e Bahia (12,05%) ou não tiveram sua origem relatada (3,61%). A sobrevida média global foi de 80,29% em 349 meses avaliados (Figura 12A).

Tabela 9: Características clínicas dos pacientes com tumor de Wilms.

Tumor de Wilms		Casos (n= 97)
Sexo		
	Masculino	46 (47,42%)
	Feminino	51 (52,58%)
Mediana de idade		48,5 meses
	Masculino	41 meses
	Feminino	51 meses
Status		
	Vivo	66 (68,04%)
	Óbito	14 (14,43%)
	Perda de Seguimento	11 (11,34%)
	Não Relatado	06 (06,19%)
Estadiamento		
	I	12 (12,37%)
	II	20 (20,62%)
	III	36 (37,11%)
	IV	09 (09,28%)
	V	01 (01,03%)
	Não Relatado	19 (19,59%)
Sinais e Sintomas		
	Dor abdominal, Aumento do volume abdominal	55 (66,27%)
	Massa abdominal	04 (04,82%)
	Outros	24 (28,92%)

Os pacientes com tumor de Wilms foram representados por 46 (47,42%) crianças do sexo masculino e 51 (52,58%) do sexo feminino. A análise da sobrevida em relação ao gênero mostrou que o sexo feminino (81,25%, 349 meses) apresenta uma sobrevivência discretamente maior em relação à

sobrevida de crianças do sexo masculino (79,27%, 252 meses), o que não representa relevância estatística ($p=0,9198$) (Figura 12B). A idade média entre eles foi de 61,04 meses (5,1 anos), a mediana da idade dos pacientes foi de 48,5 meses, sendo o paciente mais jovem diagnosticado com três meses de idade e o mais velho com 248 meses.



Entre os principais sinais e sintomas relatados pelos pacientes observou-se dor abdominal, aumento do volume abdominal, alopecia, hematúria, febre, perda de peso, presença de massa abdominal palpável, alteração do ritmo abdominal, diarreia e desidratação.

O estádio III foi mais frequentemente observado entre os pacientes estudados, sendo identificado em 37,11% pacientes. Os estádios I, II, IV e V foram relatados em 12,37%, 20,62%, 9,28% e 1,03%, respectivamente. Em cerca de 19,59% dos pacientes, o estádio não foi relatado nos prontuários médicos. No que diz respeito à análise da sobrevida, observou-se uma taxa de sobrevivência de 75,44% nos pacientes em estágio III, analisada em 349 meses, 94,73% para aqueles em estágio II, analisados em 269 meses, e 100% para os pacientes em estágio I em 252 meses. Os pacientes em estágio IV apresentaram sobrevida de 80% em 271 meses (Figura 12C).

O protocolo utilizado para tratamento de crianças diagnosticadas com tumor de Wilms baseou-se em nefrectomia, ciclos de quimioterapia e radioterapia. Os pacientes parecem ter respondido bem ao tratamento, visto que apenas 14 pacientes foram a óbito (14,43%), estando os demais casos em remissão da doença (67,01%), em tratamento (3,09%), ou foram considerados como perda de segmento por abandonarem o monitoramento clínico-ambulatorial.

5.1.4 Meduloblastoma

Foram estudados 51 pacientes (Tabela 10) a partir dos prontuários médicos. Os pacientes eram procedentes principalmente do interior do estado (66,67%), 28,57% eram da região metropolitana e 4,76% vieram de outros estados, como Rio Grande do Norte e Paraíba. A sobrevida média global observada em pacientes com MB foi de 54,29% em 266 meses (Figura 13A).

Tabela 10: Características clínicas dos pacientes com meduloblastoma.

Meduloblastoma		Casos (n= 51)
Sexo		
	Masculino	31 (60,78%)
	Feminino	20 (39,22%)
Mediana de idade		102 meses
	Masculino	107 meses
	Feminino	82 meses
Status		
	Vivo	23 (45,50%)
	Óbito	21 (41,18%)
	Perda de Seguimento	07 (13,73%)
Idade		
	< 3 anos	05 (09,80%)
	≥ 3 anos	46 (90,20%)
Metástase		
	Sim	11 (21,57%)
	Não	31 (60,78%)
	Não Relatado	09 (17,65%)
Recidiva		
	Sim	09 (17,65%)
	Não	34 (66,67%)
	Não Referenciado	08 (15,69%)
Estadiamento		
	T2M0	15 (29,41%)
	T3M0	03 (05,88%)
	T3aM0	06 (11,76%)
	T3M1	03 (05,88%)
	T3aM1	06 (11,76%)
	T3bM0	01 (01,96%)
	T3M2	01 (01,96%)
	T4M0	02 (03,92%)
	Não Relatados	14 (27,45%)

A maioria dos pacientes com meduloblastoma eram do sexo masculino (60,78%) e 39,22% eram do sexo feminino. A análise da sobrevida foi realizada nesses pacientes em relação ao gênero e ao desenvolvimento da doença, o sexo

masculino apresentou uma maior taxa de sobrevida (61,76%, 236 meses) em relação ao sexo oposto (38,46%, 266 meses), entretanto, esses dados não mostraram significância estatística ($p=0,0756$) (Figura 13B).

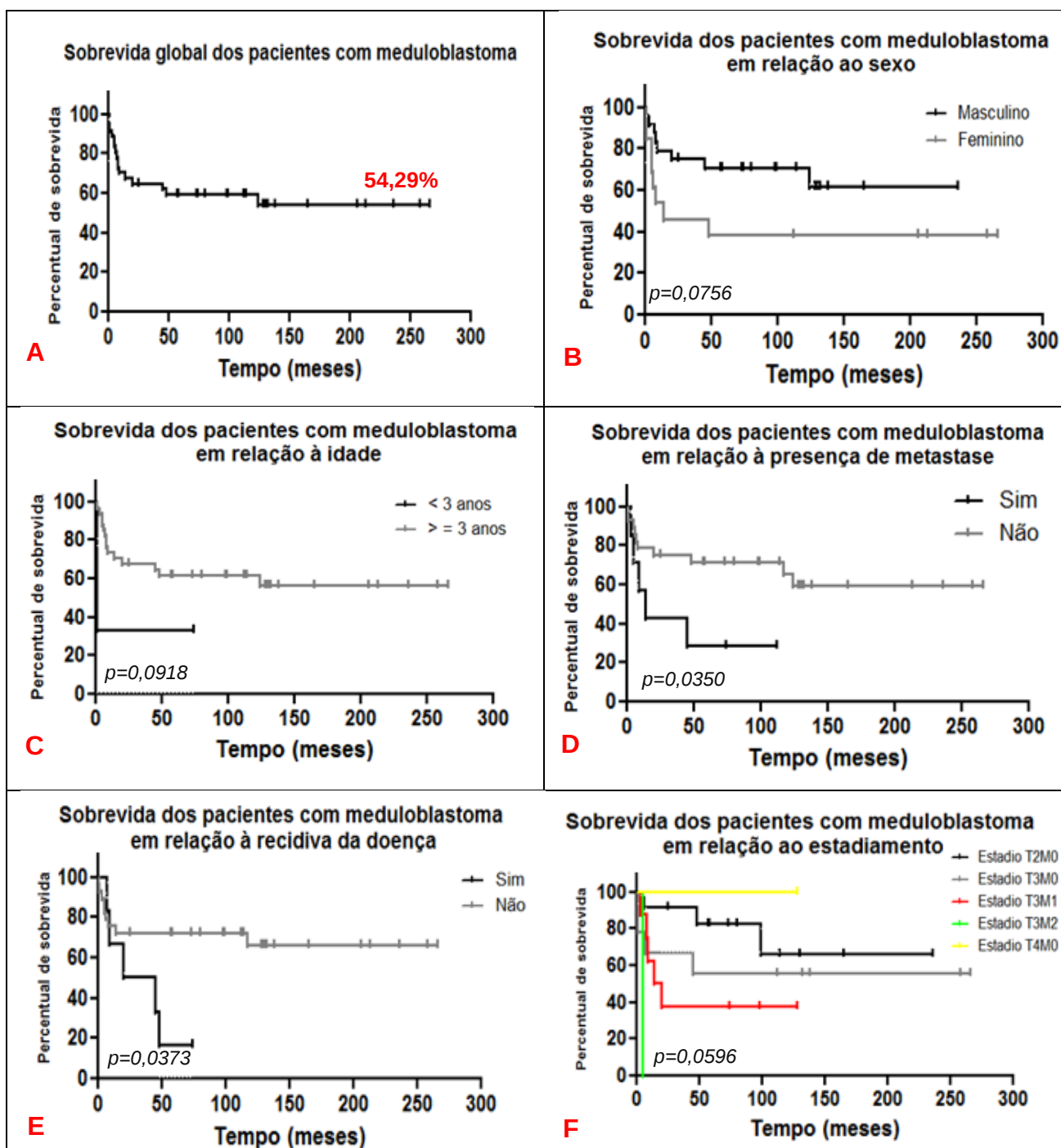


Figura 13: Análise de sobrevida dos pacientes com Meduloblastoma. **A:** Sobrevida Global de pacientes com Meduloblastoma. **B:** Sobrevida em relação ao sexo. **C:** Sobrevida em relação à idade. **D:** Sobrevida em pacientes com metástase. **E:** Sobrevida em relação à recidiva. **F:** Sobrevida em relação ao estadiamento.

A idade média das crianças com meduloblastoma foi de 110,8 meses (9,2 anos), o paciente mais jovem apresentava 14 meses e o mais velho 238 meses ao diagnóstico. A mediana da idade foi de 102 meses. Quatro pacientes (7,84%) eram menores de três anos de idade e três (75%) deles foram a óbito, com taxa de sobrevida de 33,33% (74 meses), sendo consideravelmente inferior àqueles que apresentavam idades maiores de três anos (56,37% em 266 meses), mas sem significância estatística ($p=0,0918$) (Figura 13C).

Entre os principais sinais e sintomas, a cefaléia estava presente entre as queixas de 45,24% dos pacientes, vômito em 30,95%, marcha cambaleante em 14,29%, 9,52% referiram-se a estrabismo, 4,76% apresentaram hidrocefalia, entre outras apresentações como perda de peso, convulsões, febre, náuseas, tontura, déficit de visão, etc.

Quanto à disseminação da doença, 60,78% dos pacientes com meduloblastoma apresentaram doença localizada e 21,57% tiveram metástase. Entre os pacientes com metástase, 54,5% foram à óbito, 18,18% pacientes estão vivos sem doença, 18,18% estão vivos com doença e 9,09% descontinuaram o tratamento, exibindo uma taxa de sobrevida de 28,57%, em 112 meses analisados. Em contrapartida, os pacientes com doença localizada mostraram sobrevida de 59,37%, em 266 meses (Figura 13D). Esse dado foi relevante estatisticamente ($p = 0,035$). Os pacientes que recidivaram (16,67%) apresentaram sobrevida significativamente menor em relação àqueles que não sofreram recidiva (66,37%) ($p=0,0373$) (Figura 13E).

Entre os estádios descritos por Chang *et al.* (1969), apenas os estádios T2M0, T3M0, T3aM0, T3bM0, T3M1, T3aM1, T3M2 e T4M0 foram observados entre os pacientes estudados com meduloblastoma. O estágio T2M0 foi mais

frequentemente visto entre os casos estudados, sendo identificado em 29,41%, seguido dos estádios T3aM0 (11,76%) e T3aM1 (11,76%). Os estádios T3M0 e T3M1, sem subdivisão em a e b relatada nos prontuários, estavam presentes em 5,88%. O estadio T4M0 foi observado em 3,92% e o T3bM0 em 1,96%, enquanto 27,45% dos casos não tiveram o estadiamento relatado. Entre os estádios observados, a melhor sobrevida foi associada aos pacientes em estadio T4M0 (100%, 128 meses), seguido do T2M0 (66%, 236 meses), do T3M0 (55,56%), do T3M1 (37,5%, 128 meses) e do T3M2 (0%, 5 meses), mas não foram estatisticamente significantes ($p = 0,0596$) (Figura 13F).

Os pacientes com meduloblastoma foram tratados no CEONHPE com sessões de quimioterapia e radioterapia. Entre os pacientes, 41,18% estão vivos sem a doença, 3,92% pacientes estão vivos com a doença e 41,18% pacientes foram a óbito, 13,73% descontinuaram o acompanhamento.

5.2. Resultados da Análise dos Polimorfismos

Os polimorfismos para os genes *MTHFR* (C677T) e *MTHFR* (A1298C), *MTR* (A2756G), *TYMS* (2R/3R) e *SLC19A1* (G80A) foram avaliados em amostras de pacientes com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma, e em amostras controles de indivíduos saudáveis. A população amostral foi diferente para cada um dos polimorfismos estudados em cada um dos tumores.

As distribuições genóticas de pacientes e controles para cada polimorfismo mostraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, evidenciando aderência entre as frequências genóticas observadas e esperadas. A

distribuição dos genótipos entre casos e controles para os polimorfismos estudados é apresentada nas respectivas tabelas, bem como as frequências dos alelos mutantes nas populações de pacientes analisadas e nos controles.

Adicionalmente, os *pacientes* com NB, RB, TW e MB, estudados para os polimorfismos *MTHFR C677T* e *A1298C*, *MTR A2756G*, *TYMS 2R/3R* e *SCL19A1 G80A*, foram analisados quanto à sobrevida em relação à presença dos respectivos genótipos mutantes (Anexo 3).

5.2.1 Neuroblastoma

Amostras de pacientes com neuroblastoma e amostras controle foram analisadas através do teste-G de Williams, quanto aos polimorfismos *MTHFR C677T* ($p=0,6607$), *MTHFR A1298C* ($p=0,9413$), *MTR A2756G* ($p=0,3023$) e *TYMS 2R/3R* ($p=0,0995$) (Tabela 11).

Não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes entre as distribuições dos perfis genéticos de casos e controles, sendo, dessa forma, aceita a hipótese nula. Portanto, não houve associação entre esses polimorfismos com o desenvolvimento de neuroblastoma, quando comparado com o grupo controle, não sendo possível estimar o risco que a presença de dado alelo poderia conferir para o desenvolvimento da doença.

Apenas para o polimorfismo *SLC19A1 G80A* (RFC1) foi aceita a hipótese alternativa. O teste-G de Williams indicou uma distribuição diferencial do perfil genético (GG (13,3%), AG (46,7%) e AA (40%), em pacientes, e GG (33,7%), AG (46,7 %) e AA (19,6%), em controles), sendo $p=0,0286$. Esse resultado permitiu

calcular a estimativa do risco através do teste de *Odds Ratio* (OR), sendo $OR=5,1667$; $IC\ 95\% 1,4481-18,4338$; $p = 0,0175$) (Tabela 11 e Anexo 4).

Tabela 11: Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de genes envolvidos no metabolismo do folato analisados em pacientes com Neuroblastoma e em controles livres de doença.

POLIMORFISMO	PACIENTE (%)	CONTROLE (%)	P^*	OR	IC (95%)	P^{**}
C677T (MTHFR)	n=29	n=92				
CC	09 (31,00)	37 (40,20)	0,6607	1	Referência	0,5620
CT	17 (58,70)	48 (52,20)		1,4560	(0,5833-3,6343)	
TT	03 (10,30)	07 (07,60)		1,7619	(0,3791-8,1876)	
CT+TT	20 (69,00)	55 (59,80)	0,4128	1,4949	(0,6137-3,6414)	0,5035
Trend Test*						
Alelo C	35 (60,34)	122(66,30)				
Alelo T	23 (39,66)	62 (33,70)				
A1298C (MTHFR)	n=27	n=92				
AA	16 (59,30)	52 (56,50)	0,9413	1	Referência	0,9314
AC	09 (33,30)	34 (37,00)		0,8603	(0,4614-2,9285)	
CC	02 (07,40)	06 (06,50)		1,0833	(0,1988-5,9040)	
AC+CC	11 (40,70)	40 (43,50)	0,1055	0,8938	(0,3739-2,1362)	0,9748
Trend Test*						
Alelo A	41 (75,92)	138(71,13)				
Alelo C	13 (24,08)	46 (23,71)				
A2756G (MTR)	n= 31	n=92				
AA	20 (64,50)	68 (73,90)	0,3023	1	Referência	0,7116
AG	09 (29,00)	23 (25,00)		1,3304	(0,5313-3,3313)	
GG	02 (06,50)	01 (01,10)		6,8000	(0,5858-78,9371)	
AG+GG	11 (35,50)	24 (26,10)	0,2090	1,5583	(0,6525-3,7217)	0,4397
Trend Test*						
Alelo A	49 (79,03)	159(86,41)				
Alelo G	13 (20,97)	25 (13,59)				
G80A (SLC19A1)	n= 30	n=92				
GG	04 (13,30)	31 (33,70)	0,0286*	1	Referência	0,2038
AG	14 (46,70)	43 (46,70)		2,5233	(0,7574-8,4057)	
AA	12 (40,00)	18 (19,60)		5,1667	(1,4481-18,4338)	
AG+AA	26 (86,70)	61 (66,30)	0,0312	3,3033	(1,0586-10,3080)	0,0563
Trend Test*						
Alelo G	22 (36,67)	105(87,06)				
Alelo A	38 (63,33)	79 (42,94)				
2R/3R (TYMS)	n= 29	n= 92				
2R/2R	01 (03,40)	16 (17,40)	0,0995	1	Referência	0,1425
2R/3R	15 (51,70)	45 (48,90)		6,2609	(0,7204-54,4142)	
3R/3R	13 (44,90)	31 (33,70)		6,7097	(0,8041-55,9880)	
2R/3R+3R/3R	28 (96,60)	76 (82,60)	0,0842	5,8947	(0,7466-46,5406)	0,1146
Trend Test*						
Alelo 2R	17 (29,31)	77 (48,84)				
Alelo 3R	41 (70,68)	107(58,16)				

p^* : Teste-G de Williams; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p^{**} : Odds Ratio; *: Cochran-Armitage (Trend Test)

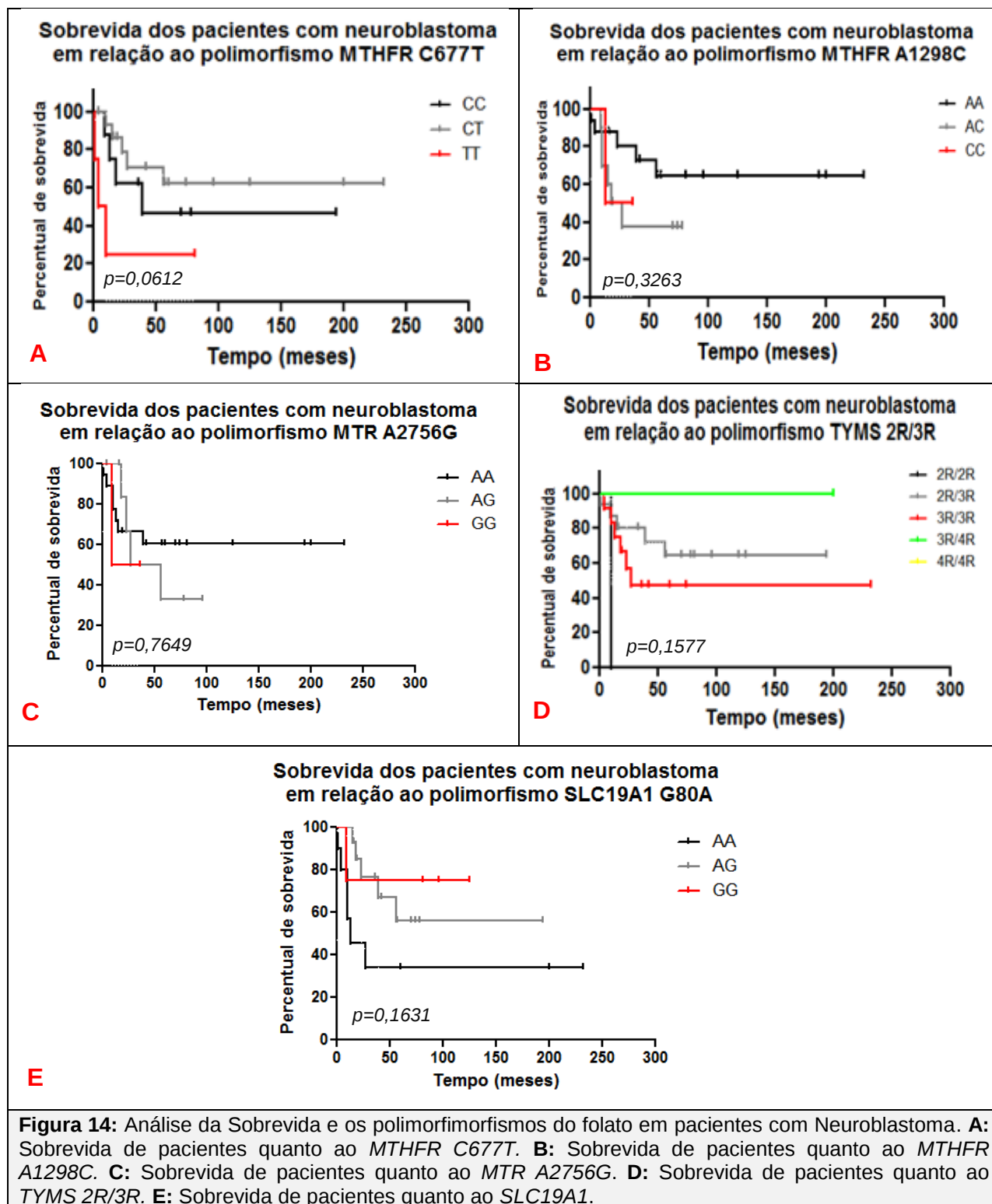
Assim, pode-se afirmar que a presença do *SLC19A1* AA foi significativamente associada ao desenvolvimento de neuroblastoma, e que os

indivíduos portadores desse genótipo (AA) apresentam 5,1667 mais chance de desenvolver a doença em relação àqueles que possuem o genótipo GG.

Em pacientes com NB, a maior taxa de sobrevida foi observada para os genótipos *MTHFR* 677CT (62,04%), *MTHFR* 1298AA (84,04%), *MTR* 2756AA (60,60%), *SLC19A1* 80GG (75%) e *TYMS* 3R/4R (100%), conforme observado na figura 14, mas nenhuma associação significativa foi observada. O número de pacientes analisados encontra-se na tabela 12, bem como as taxas de sobrevida.

Tabela 12: Distribuição genotípica e a sobrevida em pacientes com Neuroblastoma.

NEUROBLASTOMA	GENÓTIPOS	FREQUÊNCIAS	SOBREVIDA
<i>MTHFR</i> C677T		(n = 28)	<i>p</i> = 0,0612
	CC	08 (28,57%)	46,87% (194 meses)
	CT	16 (57,14%)	62,04% (232 meses)
	TT	04 (14,29%)	25,00% (81 meses)
<i>MTHFR</i> A1298C		(n = 28)	<i>p</i> = 0,3263
	AA	16 (57,14%)	64,81% (232 meses)
	AC	10 (35,71%)	37,05% (74 meses)
	CC	02 (07,14%)	50,00% (36 meses)
<i>MTR</i> A2756G		(n = 28)	<i>p</i> = 0,7649
	AA	18 (64,29%)	60,60% (232 meses)
	AG	08 (28,57%)	33,33% (96 meses)
	GG	02 (07,14%)	50,00% (36 meses)
<i>SLC19A1</i> G80A		(n = 28)	<i>p</i> = 0,1631
	GG	04 (14,29%)	75,00% (125 meses)
	GA	14 (50,00%)	55,85% (194 meses)
	AA	10 (35,71%)	34,28 (232 meses)
<i>TYMS</i> 2R/3R		(n = 30)	<i>p</i> = 0,1577
	2R/2R	01 (03,33%)	0% (10 meses)
	2R/3R	16 (53,33%)	64,28% (194 meses)
	3R/3R	12 (40,00%)	47,61% (232 meses)
	3R/4R	01 (3,33%)	100% (200 meses)



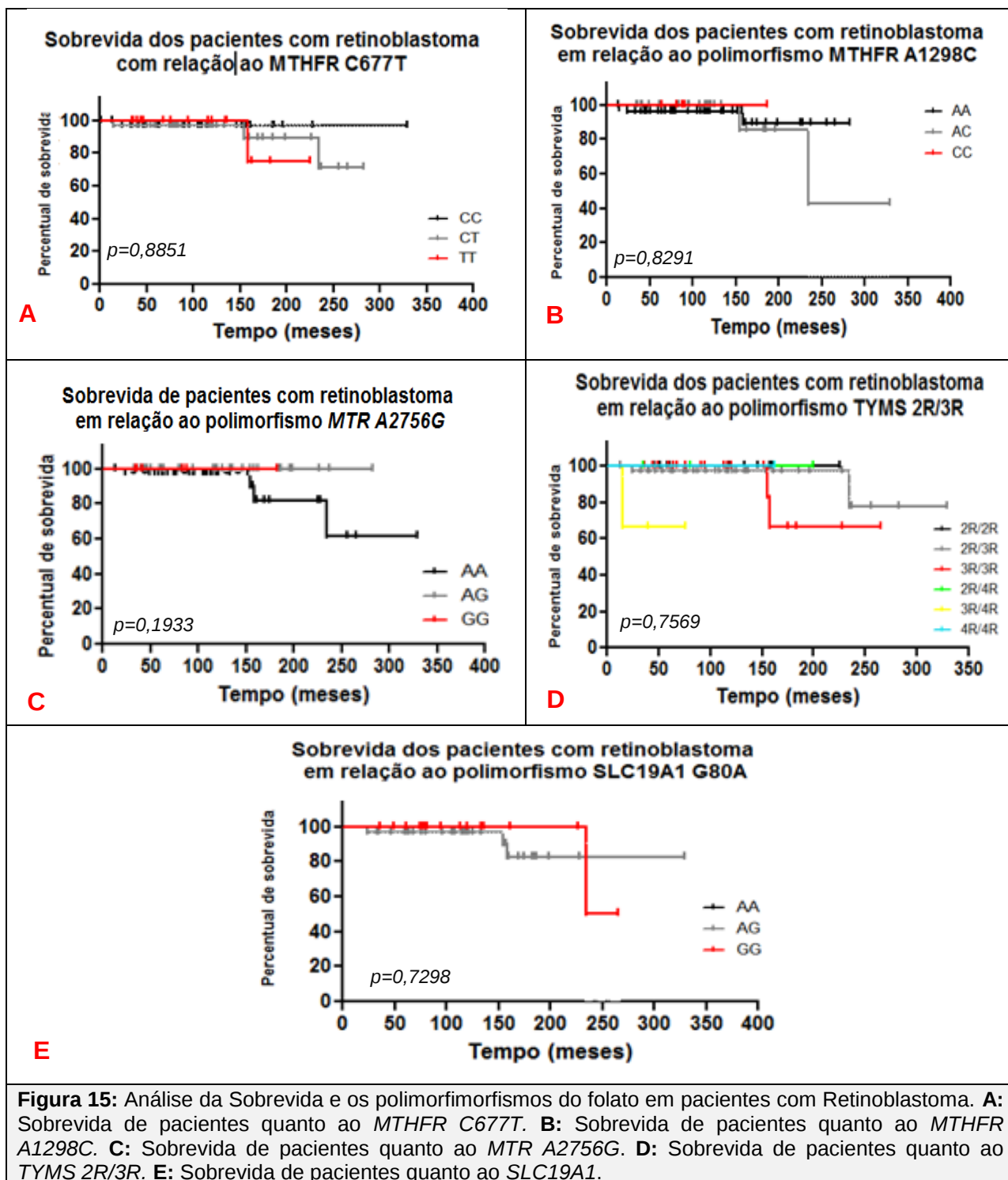
A relação entre a presença dos alelos selvagem e mutante e a taxa de sobrevivência foi analisada para polimorfismos estudados em pacientes com NB, mas não foram observadas associações estatisticamente significantes.

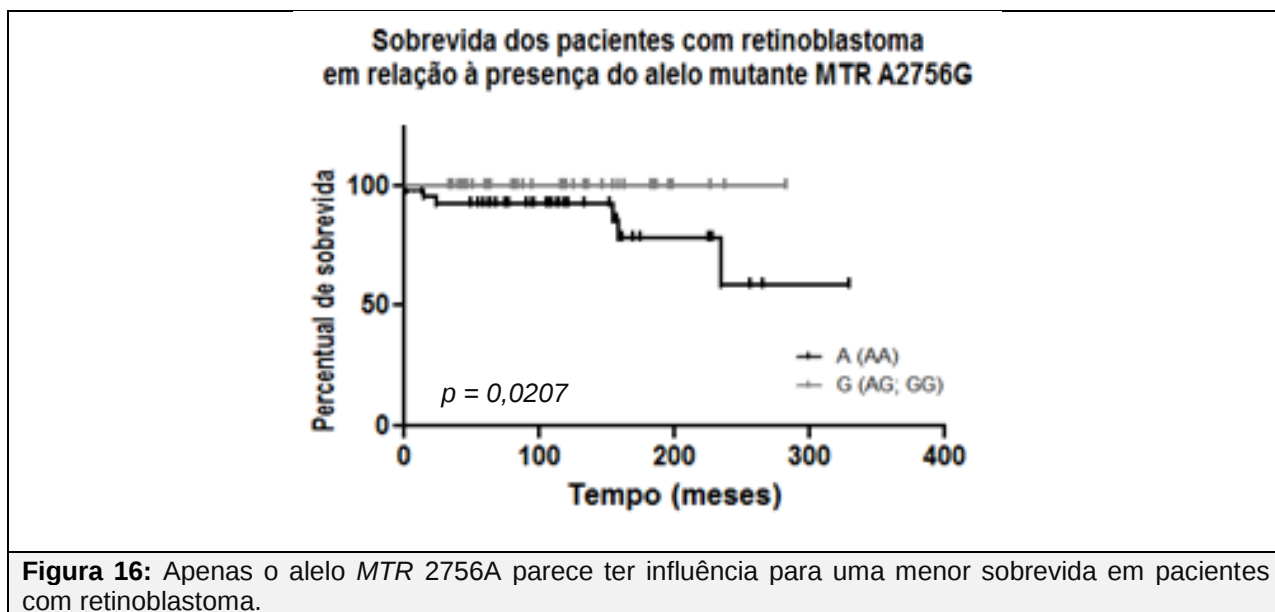
5.2.2 Retinoblastoma

A análise dos polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo do folato (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756, *SLC19A1* G80A e *TYMS* 2R/3R) em pacientes com retinoblastoma foi realizada anteriormente por nosso grupo de pesquisa e publicada em *Pediatric Blood Cancer* em 2010, cujo título do trabalho foi “*MTR Polymorphic Variant A2756G and Retinoblastoma Risk in Brazilian Children*” (De Lima *et al.* 2010). Este trabalho consistiu de estudo caso-controle com 72 crianças com retinoblastoma e 98 controles, visando investigar se os polimorfismos do folato influenciavam o risco para o retinoblastoma. Os genótipos *MTR* 2756AG e 2756GG foram mais frequentes em pacientes do que em controles (45,3% em casos e 26% em controles, $p=0,03$). Indivíduos portadores do alelo variante G apresentaram 2,02 (IC 95%:1,05–3,92) maior risco para o retinoblastoma. Em contraste, nenhuma associação foi observada para *MTHFR*, *SLC19A1* e *TYMS*.

No presente trabalho, os pacientes com RB foram analisados quanto à influência dos polimorfismos na sobrevida. A maior sobrevida foi relacionada aos genótipos *MTHFR* 677CC (96,66%) e 1298CC (100%), *MTR* 2756AG e GG (100%), *SLC19A1* 80GA (82,75%) e *TYMS* 2R2R, 2R4R e 4R4R (100%) em pacientes com RB. Entretanto, nenhuma associação significativa estatisticamente foi obtida na análise dos genótipos (Figura 15).

Contudo, a relação entre a presença dos alelos selvagem e mutante e a taxa de sobrevivência foi analisada para polimorfismos estudados em pacientes com RB, sendo observado que o alelo 2756A do gene *MTR* demonstrou associação com uma menor sobrevida em pacientes com RB (Figura 16).





O número de pacientes analisados e as taxas de sobrevida estão apresentadas na tabela 13.

Tabela 13: Distribuição genotípica e a sobrevida de pacientes com Retinoblastoma.

RETINOBLASTOMA	GENÓTIPOS	FREQUÊNCIAS	SOBREVIDA
<i>MTHFR</i> C677T		(n = 83)	$p = 0,8851$
	CC	32 (38,55%)	96,66% (329 meses)
	CT	34 (40,96%)	71,67% (282 meses)
	TT	17 (20,48%)	75,00% (225 meses)
<i>MTHFR</i> A1298C		(n = 81)	$p = 0,8291$
	AA	51 (62,96%)	89,52% (282 meses)
	AC	25 (30,86%)	42,85% (329 meses)
	CC	05 (06,17%)	100% (186 meses)
<i>MTR</i> A2756G		(n = 82)	$p = 0,1933$
	AA	41 (50,00%)	61,32 (329 meses)
	AG	35 (42,68%)	100% (282 meses)
	GG	06 (07,32%)	100% (183 meses)
<i>SLC19A1</i> G80A		(n = 80)	$p = 0,7298$
	GG	20 (25,00%)	50,00% (265 meses)
	GA	36 (45,00%)	82,75% (329 meses)
	AA	24 (30,00%)	50,00% (265 meses)
<i>TYMS</i> 2R/3R		(n = 83)	$p = 0,7569$
	2R/2R	11 (13,25%)	100% (225 meses)
	2R/3R	40 (48,19%)	77,94% (329 meses)
	3R/3R	25 (30,12%)	66,66% (265 meses)
	2R/4R	03 (03,61%)	100% (199 meses)
	3R/4R	03 (03,61%)	66,66% (76 meses)
	4R/4R	01 (01,20%)	100% (162 meses)

5.2.3 Tumor de Wilms

Pacientes com tumor de Wilms e amostras controle foram analisados quanto aos polimorfismos *MTHFR C677T* ($p=0,3760$) e *TYMS 2R/3R* ($p=0,8630$), através do teste-G de Williams (Tabela 14), não sendo observadas diferenças significantes estatisticamente entre as distribuições dos perfis genéticos de casos e controles, portanto, foi aceita a hipótese nula para a análise desses polimorfismos. Dessa forma, não houve associação entre o desenvolvimento de tumor de Wilms e os polimorfismos *MTHFR C677T* e o *TYMS 2R/3R*, não sendo possível estimar o risco que a presença do polimorfismo poderia conferir para o desenvolvimento da doença.

Contudo, foi observada uma distribuição diferencial do perfil genético entre pacientes com tumor de Wilms (33,33% AA, 63,34% AC e 3,33% CC), e controles sadios (58,88% AA, 34,44% AC e 6,66% CC) para o polimorfismo *MTHFR A1298C*, através da análise pelo teste-G de Williams, sendo, portanto, aceita a hipótese alternativa. Foi evidenciada uma possível relação entre o alelo C e o desenvolvimento da doença, além de uma representação superior do genótipo heterozigoto AC em relação aos genótipos homozigotos AA e CC, sendo $p=0,0270$. A frequência do genótipo CC foi pequena, o que poderia justificar a ausência de uma relação estatisticamente significativa com o desenvolvimento da doença (Tabela 14).

Esse fato possibilitou calcular a estimativa do risco quando os genótipos AC + CC foram analisados em conjunto, através do teste de *Odds Ratio* (OR), sendo $OR= 2,865$ (IC 95%, 1,203-6,821; $p = 0,0260$). Dessa forma, os portadores do alelo C exibiram 2,865 vezes maior risco de desenvolver a neoplasia em relação àqueles com o alelo selvagem A (Tabela 14).

Essa associação de risco também foi vista na presença do genótipo AC, decorrente da presença do alelo C, sendo exibida uma $OR=3,280$ (IC 95% 1,341-7,868; $p=0,0140$), ou seja, os portadores do genótipo AC apresentam 3,280 mais chances de desenvolver a neoplasia em relação aos portadores dos genótipos homozigotos AA e CC.

Tabela 14: Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de genes envolvidos no metabolismo do folato analisados em pacientes com Tumor de Wilms e em controles livres de doença.

POLIMORFISMO	PACIENTE (%)	CONTROLE (%)	P^*	OR	IC (95%)	P^{**}
C677T (MTHFR)	n= 42	n= 90				
CC	14 (33,33)	35 (38,88)		1	Referência	NA
CT	27 (64,29)	47 (52,22)	0,3760	1,436	0,658-3,132	0,474
TT	01 (02,38)	08 (08,88)		0,312	0,035-2,735	0,493
CT+TT	28 (66,66)	55 (61,11)		1,272	0,560-2,746	0,673
Trend Test*			0,1480			
Alelo C	55 (65,48)	117 (65,00)				
Alelo T	29 (34,52)	63 (35,00)				
A1298C (MTHFR)	n= 30	n= 90				
AA	10 (33,33)	53 (58,88)		1	Referência	NA
AC	19 (63,34)	31 (34,44)	0,0270*	3,280	1,341-7,868	0,014
CC	01 (03,33)	06 (06,66)		0,883	0,096-8,152	0,661
AC+CC	20 (66,67)	37 (41,11)		2,865	1,203-6,821	0,026
Trend Test*			0,0130			
Alelo A	39 (65,00)	137 (76,10)				
Alelo C	21 (35,00)	43 (23,90)				
A2756G (MTR)	n= 37	n= 90				
AA	18 (48,65)	65 (72,22)		-	-	-
AG	19 (51,35)	24 (26,66)	x	-	-	-
GG	-	01 (01,11)		-	-	-
AG/GG	19 (51,35)	25 (27,77)		-	-	-
Trend Test*						
Alelo A	55 (74,32)	154 (85,60)				
Alelo G	19 (25,68)	26 (14,40)				
G80A (SLC19A1)	n= 10	n= 90				
GG	-	31 (33,70)		-	-	-
AG	09 (90,00)	43 (46,70)	x	-	-	-
AA	01 (10,00)	16 (19,60)		-	-	-
GA+AA	10 (10,00)	59 (66,30)		-	-	-
Trend Test*						
Alelo G	09 (45,00)	105 (57,00)				
Alelo A	11 (55,00)	79 (43,00)				
2R3R(TYMS)	n= 22	n= 90				
2R	03 (13,64)	16 (17,40)		1	Referência	NA
2R3R	13 (59,09)	44 (48,90)	0,8630	1,576	0,396-6,261	0,745
3R(4R)	06 (27,27)	30 (33,70)		1,066	0,235-4,843	0,764
2R3R+3R3R	19 (86,36)	74 (82,22)		1,369	0,361-3,189	0,883
Trend Test*			0,9150			
Alelo 2R	19 (43,18)	77 (42,00)				
Alelo 3R	25 (56,82)	107 (58,00)				

p^+ : Teste-G de Williams; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p^{++} : Odds Ratio; *: Cochran-Armitage (Trend Test); x: Análise estatística não realizada devido à ausência do genótipo na população estudada.

Os genótipos GG (*MTR* A2756G) e o GG (*SLC19A1* G80A) não foram observados na análise da população de pacientes estudada, por isso não foi possível calcular associações de risco para esse tumor. Conforme observado através da análise dos controles (Tabela 14), a frequência do genótipo GG (*MTR* A2756G → GG= 1,01%) foi relativamente baixa, o que fortalece a necessidade do aumento da população amostral adotada para permitir o surgimento do genótipo na população. O aumento da amostra em estudo também parece importante para o aparecimento do genótipo *SLC19A1* GG.

Quanto à análise da sobrevida em relação aos genótipos observados, os pacientes com TW apresentaram os genótipos *MTHFR* 677TT (100%), *MTHFR* 1298AC (88,23%), *MTR* 2756AG (93,75%) e *SLC19A1* 80GA (82,75%) associados a uma discretamente melhor sobrevida. O *TYMS* 2R/2R e 3R/3R (100%) mostrou melhor sobrevida em relação à *TYMS* 2R/3R (72,72%). Os genótipos 1298CC, 2756GG e 80GG não foram observados na população estudada. Os resultados obtidos não apresentaram significância estatística e estão dispostas na tabela 15 e na figura 17.

Tabela 15: Distribuição genotípica e a sobrevida em pacientes com Tumor de Wilms.

TUMOR DE WILMS	GENÓTIPOS	FREQUÊNCIAS	SOBREVIDA
<i>MTHFR</i> C677T		(n = 35)	$p = 0,8642$
	CC	12 (34,29%)	91,66% (246 meses)
	CT	22 (62,86%)	86,36% (277 meses)
	TT	01 (02,86%)	100% (231 meses)
<i>MTHFR</i> A1298C		(n = 25)	$p = 0,9989$
	AA	08 (32,00%)	87,50% (129 meses)
	AC	17 (68,00%)	88,23% (277 meses)
	CC	-	-
<i>MTR</i> A2756G		(n = 31)	$p = 0,4864$
	AA	15 (48,39%)	86,66% (269 meses)
	AG	16 (51,61%)	93,75% (277 meses)
	GG	-	-
<i>SLC19A1</i> G80A		(n = 8)	$p = 0,5780$
	GG	-	-
	GA	07 (87,50%)	71,42% (92 meses)
	AA	01 (12,50%)	100% (231 meses)
<i>TYMS</i> 2R/3R		(n = 21)	$p = 0,2580$
	2R/2R	03 (14,29%)	100% (200 meses)
	2R/3R	11 (52,38%)	72,72% (277 meses)
	3R/3R	06 (28,57%)	100% (269 meses)

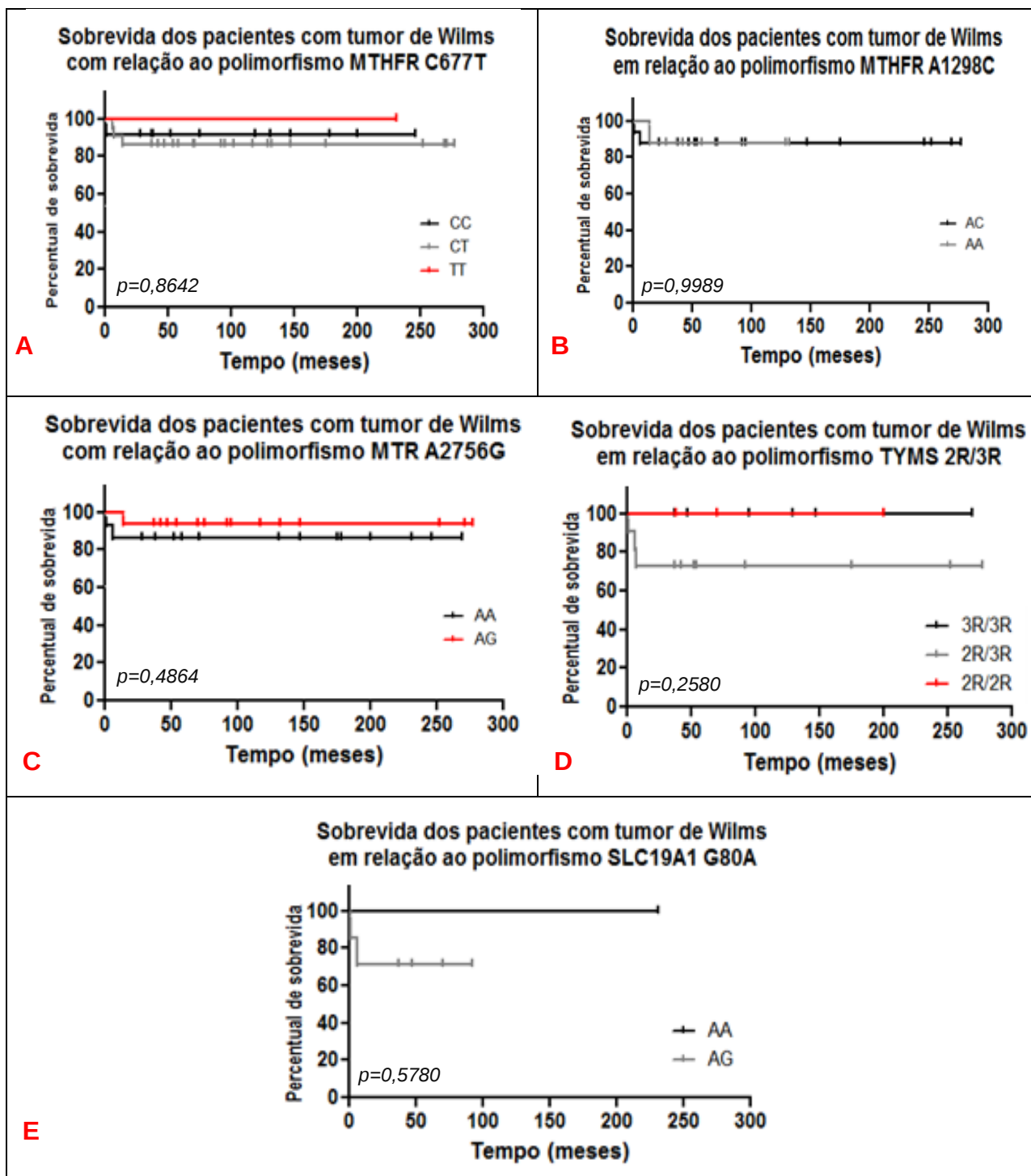


Figura 17: Análise da Sobrevida e os polimorfismos do folato em pacientes com Tumor de Wilms. **A:** Sobrevida de pacientes quanto ao *MTHFR* C677T. **B:** Sobrevida de pacientes quanto ao *MTHFR* A1298C. **C:** Sobrevida de pacientes quanto ao *MTR* A2756G. **D:** Sobrevida de pacientes quanto ao *TYMS* 2R/3R. **E:** Sobrevida de pacientes quanto ao *SLC19A1*.

A relação entre a presença dos alelos e a taxa de sobrevivência foi analisada, mas não foi observada associação estatisticamente significativa.

5.2.4 Meduloblastoma

Amostras de pacientes com meduloblastoma e amostras controle foram analisadas através do teste exato de Fisher quanto aos polimorfismos *MTHFR* C677T ($p=0,2170$), *MTHFR* A1298C ($p=0,6120$), *MTR* A2756G ($p=0,5480$), *SLC19A1* ($p=0,4070$) e *TYMS* 2R/3R ($p=0,5740$) (Tabela 16).

Tabela 16: Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de genes envolvidos no metabolismo do folato analisados em pacientes com Meduloblastoma e controles

POLIMORFISMO	PACIENTE (%)	CONTROLE (%)	P^*	OR	IC (95%)	P^{**}
C677T (<i>MTHFR</i>)	n=12	n=30				
CC	05 (41,67)	09 (30,00)	0,217	1	Referência	NA
CT	03 (25,00)	19 (63,30)		0,284	0,055-1,459	0,253
TT	04 (33,33)	02 (06,60)		3,600	NA	0,432
CT+TT	07 (58,33)	21 (70,00)		0,600	0,149- 2,404	0,717
Trend Test*			0,186			
Alelo C	13 (54,17)	37 (61,70)				
Alelo T	11 (45,83)	23 (38,30)				
A1298C (<i>MTHFR</i>)	n=12	n=30				
AA	06 (50,00)	16 (53,33)	0,612	1	Referência	NA
AC	05 (41,67)	10 (33,33)		1,333	0,320-5,548	0,976
CC	01 (08,33)	04 (13,33)		0,666	NA	0,818
AC+CC	06 (50,00)	14 (46,66)		1,143	0,299-4,363	0,883
Trend Test*			0,480			
Alelo A	17 (70,83)	42(70,00)				
Alelo C	07 (29,17)	18 (30,00)				
A2756G (<i>MTR</i>)	n= 12	n=30				
AA	09 (75,00)	20 (66,66)	0,548	1	Referência	NA
AG	02 (16,67)	09 (30,00)		0,493	0,088-2,764	0,677
GG	01 (08,33)	01 (03,33)		2,232	NA	0,820
AG+GG	03 (25,00)	10 (33,33)		0,666	0,147-3,021	0,874
Trend Test*			0,431			
Alelo A	20 (83,33)	49 (81,70)				
Alelo G	04 (16,67)	11 (18,30)				
G80A (<i>SLC19A1</i>)	n= 12	n=30				
GG	02 (16,67)	12 (40,00)	0,407	1	Referência	NA
AG	08 (66,67)	13 (43,33)		3,692	0,650-20,970	0,252
AA	02 (16,67)	05 (16,66)		2,400	0,260-22,106	0,844
AG+AA	10 (100,00)	18 (60,00)		3,333	0,618-17,971	0,277
Trend Test*			0,463			
Alelo G	12 (50,00)	37 (61,70)				
Alelo A	12 (50,00)	23 (38,30)				
2R/3R (<i>TYMS</i>)	n= 13	n=30				
2R/2R	02 (15,38)	06 (20,00)	0,574	1	Referência	NA
2R/3R	09 (69,24)	15 (50,00)		1,800	0,297 – 10,901	0,829
3R/3R	02 (15,38)	09 (30,00)		0,666	NA	0,833
2R/3R+3R/3R	11 (84,62)	24 (80,00)		1,375	0,238-7,930	0,944
Trend Test*			0,513			
Alelo 2R	13 (50,00)	27 (45,00)				
Alelo 3R	13 (50,00)	33 (55,00)				

p^* : Teste Exato de Fisher; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; p^{**} : Odds Ratio.

Devido ao pequeno tamanho amostral, não foi possível estabelecer conclusões para análise dos polimorfismos em pacientes com meduloblastoma, sendo assim, mais estudos são necessários. Contudo, até o momento, as distribuições dos perfis genéticos entre casos e controles não apresentaram diferenças significantes estatisticamente, sendo considerada a hipótese nula.

Portanto, associações entre os polimorfismos estudados e o grupo controle, no desenvolvimento do meduloblastoma, não foram evidenciadas. Dessa forma, não foi possível estimar o risco que a presença dos genótipos para *MTHFR*, *MTR*, *SLC19A1* e *TYMS* poderia conferir para o desenvolvimento da doença.

Os genótipos obtidos foram utilizados para análise de sobrevida, entretanto, não foram observados óbitos para os casos de MB estudados e, portanto, a taxa de sobrevida foi 100% entre os pacientes com essa malignidade, sendo assim, os resultados não foram estatisticamente significativos.

5.3 Resultados da Análise Citogenética Clássica e Molecular

A técnica de citogenética convencional para tumores sólidos foi implantada no Laboratório de Citogenética do CEONHPE/HUOC/UPE, sendo aplicada em 23 pacientes com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma (Tabela 18).

Como amostra controle, dez pacientes com outros tipos de tumores também foram estudados, entre eles: osteossarcoma, linfoma de Burkitt, Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Linfoma, Sarcoma, LLA-T, Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ) e Câncer de bexiga (Tabela 19).

As taxas de sucesso e insucesso foram 13,04% e 86,96%, respectivamente, no que diz respeito à cultura de células para os tumores estudados. Seis casos foram enviados para laboratório colaborador em Jena/Alemanha (5 casos) e Ribeirão Preto (1 caso), mas não obtiveram sucesso nas análises dos casos analisados em Jena devido à qualidade do material. Entretanto, foram realizadas as técnicas de FISH e SKY com sucesso em Ribeirão Preto (Anexo 5).

A técnica foi aplicada a outros tumores (controle), conforme descrito na Tabela 19. Mas as mesmas dificuldades também foram observadas. As taxas de sucesso e insucesso foram de 20 e 80%, respectivamente.

Tabela 17: Portadores de NB, RB, TW e MB submetidos à cultura de células de longa duração e resultados observados.

Observados.

Paciente	Tumor	Amostra	Resultados Citogenética Clássica	Resultados em Laboratório de Apoio	
1.	MBA	RB	TU	Cultura sem núcleos e sem metáfases, com discreta contaminação	-
2.	BNSH	TW	TU	Cultura com núcleos	-
3.	MHNM	NB	TU	Cultura com pouquíssimos núcleos e sem metáfase	-
4.	ATOS	NB	MO	Cultura com pouquíssimos núcleos e sem metáfase	-
5.	-	MB	TU	Células com bom crescimento, entretanto interrompidas pela presença de contaminação bacteriana. Poucos Núcleos	-
6.	JVS	RB	TU	Cultura sem núcleos e sem metáfases – presença de contaminação bacteriana	-
7.	MVS	NB	TU	Pouquíssimas metáfases pequenas e condensadas, impossíveis para análise convencional	Amostra enviada para Jena - Impossível para análise
8.	ALSB	NB	MO infiltrada	Cultura com presença de núcleos Metáfases pequenas e condensadas de difícil análise	Amostra enviada para Jena-FISH para as regiões 1p36 e N-myc - inconclusivo
9.	CGGC	RB	TU	Com núcleos aglomerados, sem metáfases	-
10.	MJS	RB	TU	Cultura com contaminação bacteriana intensa e poucas células Cultura de Sangue Periférico: 46,XX	-
11.	RASL	NB	TU	49~50,XY,add(2p),del(1q),del(17q),i(C),+C,+C,+C,-D,-G,+mar	Amostra enviada para Jena – FISH para regiões 1p36 e N-myc – 1 metáfase normal
12.	MVP	RB	MO infiltrada	48,XX,+1,+1dup(5)(q11.2;q35),+i(6p),del(13)(q12;q14),add(14)(q32),dic(15;22)(p11.1;q13)	Amostra enviada para Ribeirão Preto –SKY Artigo publicado
13.	VASN	NB	MO infiltrada	46,XY,add(2p)	Amostra enviada para Jena – FISH para regiões 1p36, N-myc e WCP2 – inconclusivo
14.	FSBA	TW	MO infiltrada	Cultura sem metáfases	-
15.	JJA	RB	MO infiltrada	Cultura com presença de núcleos pouquíssimas metáfases pequenas e condensadas, impossíveis para análise convencional	-
16.	HJSN	NB	MO infiltrada	Cultura sem metáfases	-
17.	EDNS	NB	MO	Medula óssea não infiltrada	-
18.	GHSF	NB	MO infiltrada	Cultura com poucos núcleos, índice mitótico muito baixo, impossível para análise convencional	Amostra enviada para Jena - inconclusivo
19.	MLS	NB	MO	Medula óssea não infiltrada	-
20.	MGSC	NB	MO infiltrada	Pouquíssimas células infiltradas na medula. Amostra Inadequada: rico em hemácias, dificultando a aderência e proliferação celular. Crescimento não satisfatório, com contaminação. Não foi feita a ressecção cirúrgica, criança tratada apenas com protocolos de quimioterapia.	-
21.	JESS	NB	TU	Pouco material (biópsia por agulha) Pouquíssimas metáfases condensadas, impossíveis para análise convencional Amostra contaminada	-
22.	AMFS	RB	TU	Amostra contaminada – contaminação detectada antes da incubação do material Cultura com presença de núcleos e poucas metáfases, impossíveis para análise convencional	-
23.	JAML	RB	TU	Amostra contaminada – contaminação detectada antes da incubação do material Cultura com presença de núcleos sem metáfases	-

NB=neuroblastoma; RB=retinoblastoma; TW=Tumor de Wilms; MB=Meduloblastoma; TU=Tumor; MO=Medula.

Tabela 18: Tumores controle submetidos à cultura de células de longa duração e resultados observados.

Paciente	Tumor	Amostra	Resultados Citogenética Clássica	Resultados em Laboratório de Apoio
1.	JLL	Osteossarcoma	TU	Cultura contaminada
2.	PMS	Linfoma de Burkitt	TU	46,XX,t(8;14)(q24;q32),?der(Xp)
3.	JNF	LMA-M0	MO	Cultura contaminada
4.	MCGS	LLA	MO	46,XX
5.	VGSO	Sarcoma	TU	Pouquíssimas metáfases pequenas e condensadas, impossíveis para análise convencional
6.	TS	LLA-T	MO	Cultura contaminada
7.	VM	Leucemia	MO	Cultura contaminada
8.	DP	Leucemia	MO	Cultura contaminada
9.	LGA	LMMJ	MO	Cultura contaminada
10.	EGB	Sarcoma de Bexiga	TU	Pouca amostra (Biópsia por agulha) Cultura contaminada

TU=Tumor; MO=Medula óssea.

Contudo, ainda foi obtido sucesso nas culturas dos pacientes RASL (49~50,XY,add(2p),del(1q),del(17q),i(C),+C,+C,+C,-D,-G,+mar) (Figura 18), VASN (46,XY,add(2p)) (Figura 19) e MVP (48,XX,+1,+1dup(5)(q11.2;q35),+i(6p),del(13)(q12;q14),add(14)(q32),dic(15;22)(p11.1;q13) (Figura 20 / Anexo 5). A amostra do paciente MVP foi submetida a cultura de 24 horas.

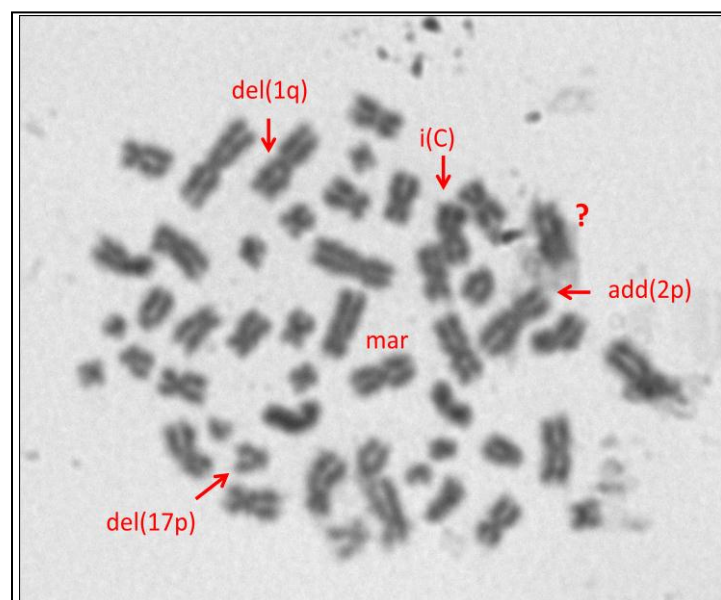


Figura 18: Cariótipo de RASL (Neuroblastoma) obtido a partir de cultura de longa duração: (49~50,XY,add(2p),del(1q),del(17q),i(C),+C,+C,+C,-D,-G,+mar).

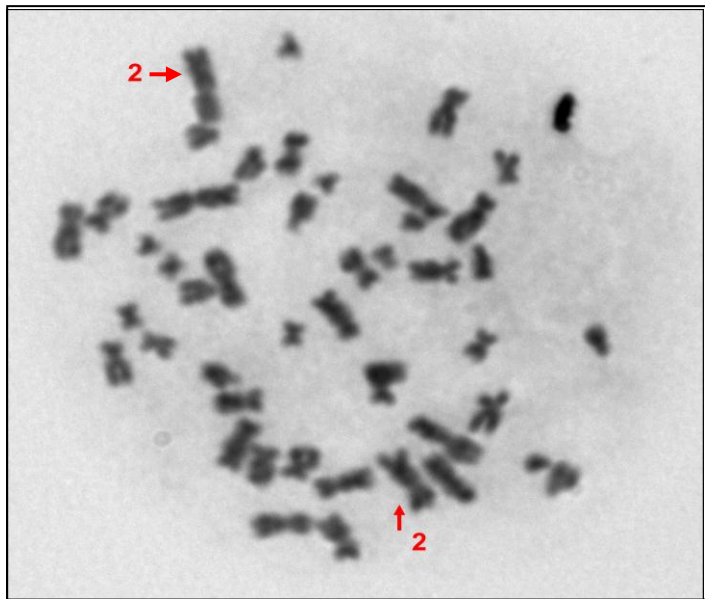


Figura 19: Cariótipo de VASN (Neuroblastoma) obtido a partir de cultura de longa duração: 46,XY,add(2p).

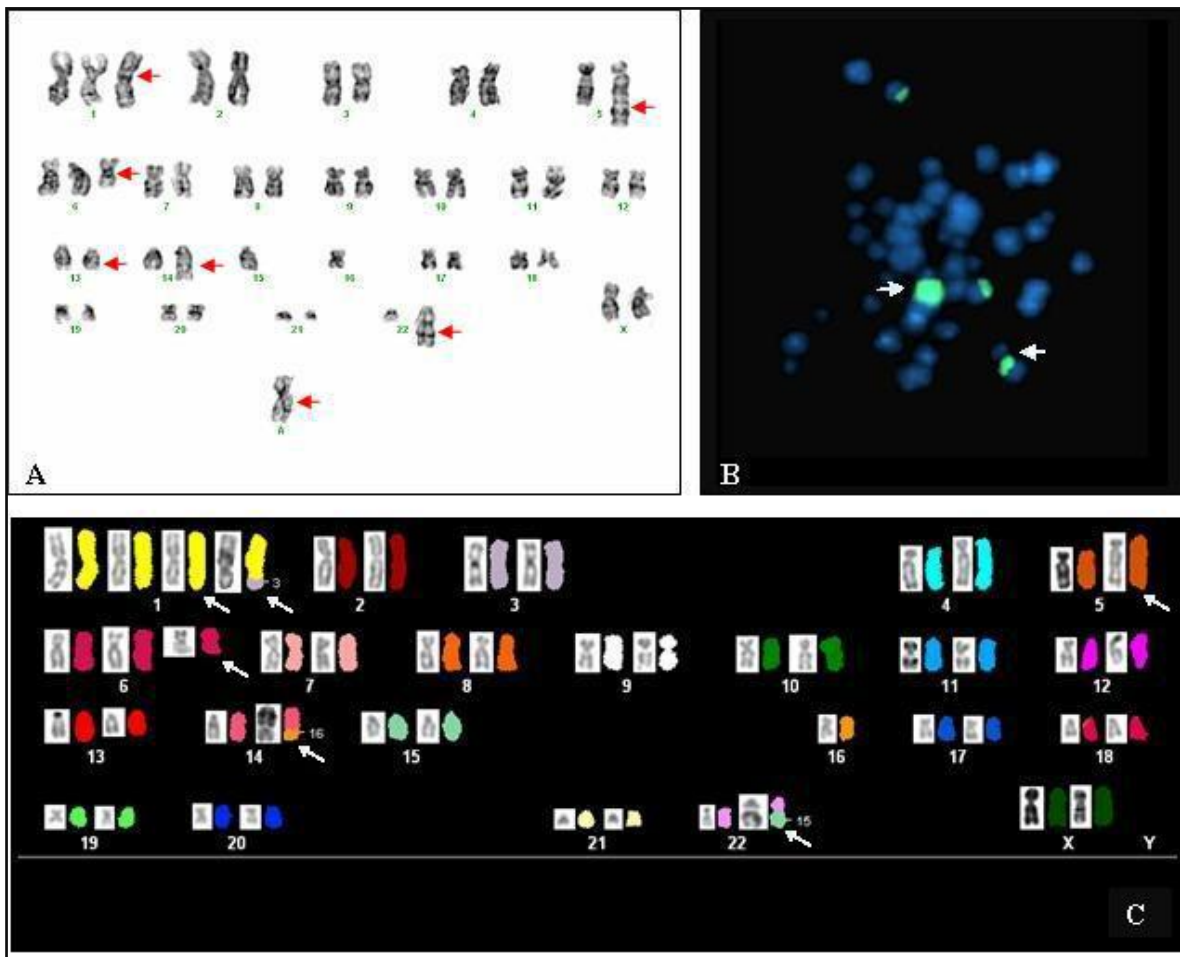


Figure 20. Análise do paciente MVP através do Bandejamento G, FISH e SKY. **A.** Cariótipo obtido por bandeamento G: 47,XX,+1,dup(5)(q11.2;q35),+i(6)(p10),del(13)(q12;q14),add(14)(q32),dic(15;22)(p11.1;q13),-16,+mar[10]. **B.** FISH usando sonda para 6p, indicando i(6p). **C.** SKY mostrando um padrão DAPI invertido (à esquerda) e o perfil de cada cromossomo (à direita). Foram observadas cópias extras do cromossomo 1, onde uma delas tem uma inserção de parte do cromossomo 3, ins(1;3)(q21;q26q29),dup(5)(q11.2;q35),+i(6)(p10),del(13)(q12;q14),t(14;16)(q32;q11.1),dic(15;22)(p11.1;q13), indicados por setas.

As técnicas de extração de tecido tumoral armazenados em blocos de parafina e FISH utilizadas nesse estudo foram implantadas no Laboratório de Citogenética do CEONHPE/HUOC/UPE.

Apenas dez casos de pacientes com neuroblastoma foram analisados quanto ao estudo citogenético molecular, utilizando a sonda para investigação loco específica do gene *n-myc*. Os resultados podem ser observados na tabela 20 e nas figuras 21, 22 e 23.

Tabela 19: Resultados da análise citogenética molecular em amostras parafinadas de pacientes com neuroblastoma.

Pacientes estudados	Resultados da análise por FISH
1. AGLV	nuc ish (<i>n-myc</i> x 4) [54%] / (<i>n-myc</i> x 2) [46%]
2. ALBS	nuc ish (<i>n-myc</i> x 2) [100%]
3. HJSN	nuc ish (<i>n-myc</i> x 2) [100%]
4. JESS	nuc ish (<i>n-myc</i> x 2) [100%]
5. MVS	nuc ish (<i>n-myc</i> x 3) [100%]
6. RASL	nuc ish (<i>n-myc</i> x 2) [100%]
7. VASN	nuc ish (<i>n-myc</i> x 2) [100%]
8. JJ	nuc ish (<i>n-myc</i> x 2) [100%]
9. JE	nuc ish (<i>n-myc</i> x 3) [100%]
10. AT	nuc ish (<i>n-myc</i> x 2) [100%]

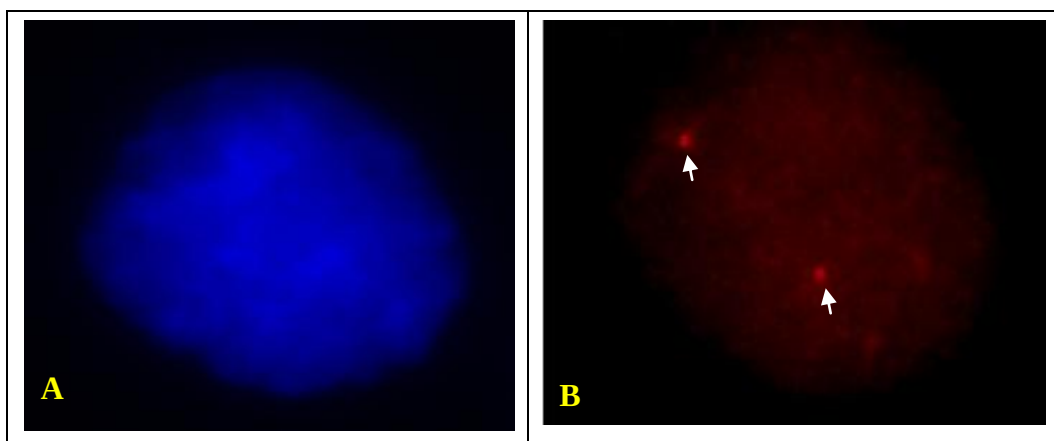


Figura 21: Identificando duas cópias do gene *n-myc* por FISH. A: DAPI. B: Texas Red.

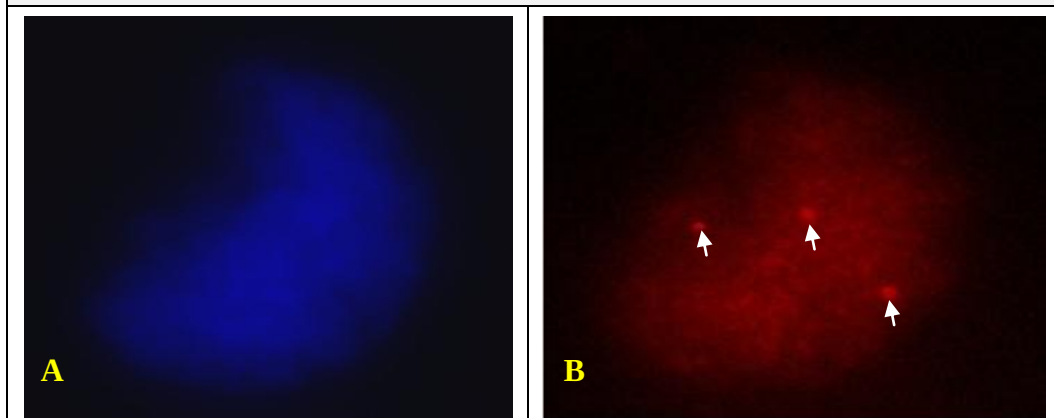


Figura 22: Identificando três cópias do gene *n-myc* por FISH. A: DAPI. B: Texas Red.

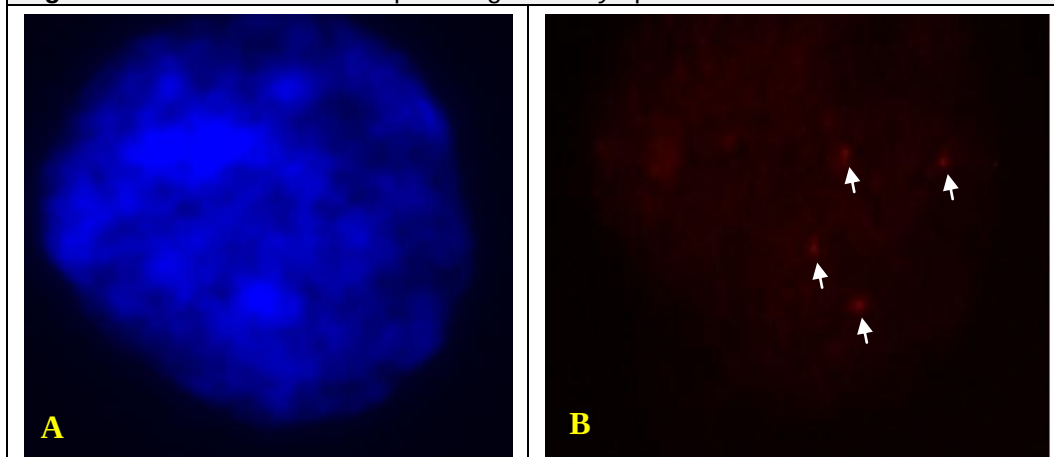


Figura 23: Identificando quatro cópias do gene *n-myc* por FISH. A: DAPI. B: Texas red.

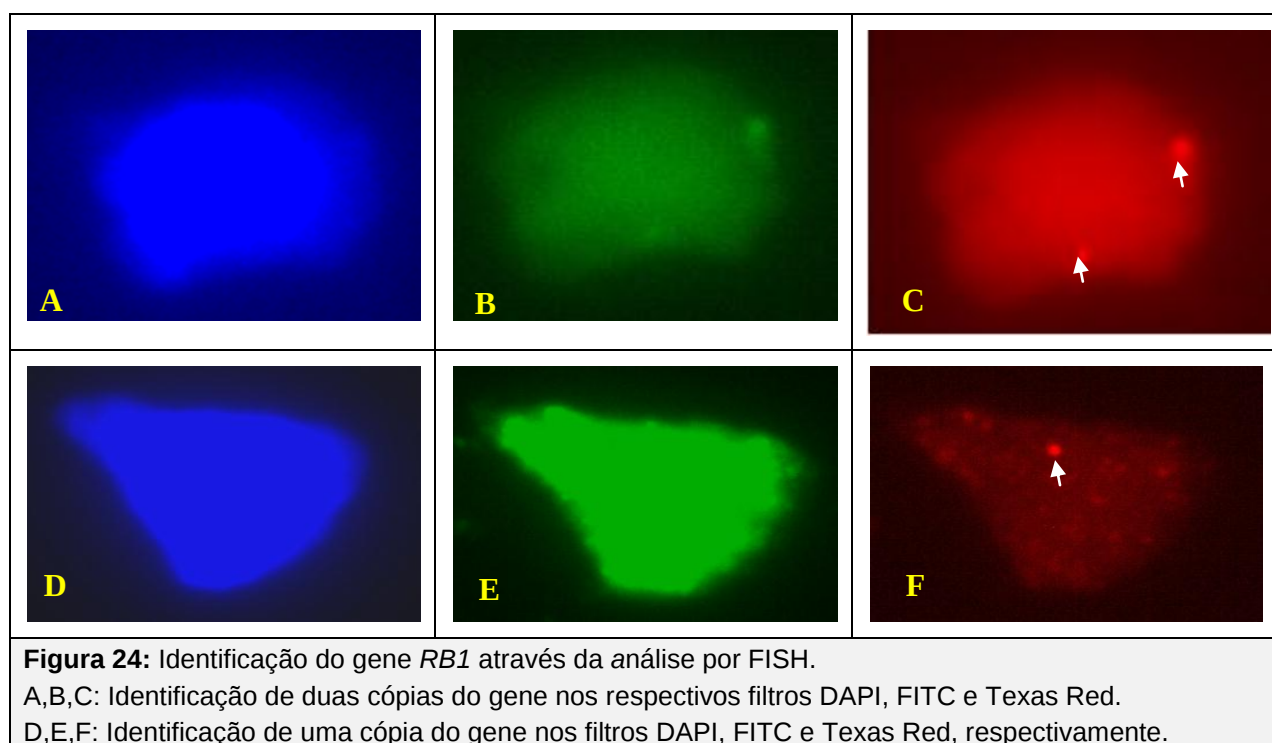
Os resultados da análise citogenética molecular de pacientes com retinoblastoma estão exibidos na tabela 21. Foi analisado um total de 41 casos com uma média de 20 núcleos analisados para cada um deles. A análise por

FISH detectou a deleção do gene *RB1* (Figura 24) em dez casos (24,4%), em 30 casos (73,2%) foi observada a presença de duas cópias do gene *RB1* (Figura 24). Apenas um caso (2,4%) apresentou duas populações de células, sendo 62% dos núcleos com a deleção do gene e 38% com a presença de duas cópias do gene.

Tabela 20: Resultados da análise citogenética molecular em amostras parafinadas de pacientes com retinoblastoma.

Pacientes estudados	Resultados da análise por FISH
1. AJS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
2. PARA	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
3. AVS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
4. AKAS	nuc ish (RB1 x 1) [100%]
5. AELS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
6. BRS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
7. CVS	nuc ish (RB1 x 1) [62%]/(RB1 x 2) [38%]
8. CDGL	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
9. CMS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
10. DBS	nuc ish (RB1 x 1) [100%]
11. DSC	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
12. DPSP	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
13. DGLL	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
14. ESSJ	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
15. EFS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
16. ELS OD	nuc ish (RB x 1) [100%]
17. ELS OE	nuc ish (RB1 x 1) [100%]
18. EV	nuc ish (RB1 x 1) [100%]
19. GKST	nuc ish (RB1 x 1) [100%]
20. GML	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
21. IMS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
22. JJA	nuc ish (RB1 x 1) [100%]
23. JHF	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
24. JELO	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
25. JGBS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
26. JRS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]

27. LJS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
28. LJDS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
29. MSL	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
30. MMS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
31. MVC	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
32. MFSL	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
33. MRRO	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
34. MSD	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
35. MDDS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
36. PL	nuc ish (RB1 x 1) [100%]
37. PHS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
38. RFA	nuc ish (RB1 x 1) [100%]
39. RSS	nuc ish (RB1 x 2) [100%]
40. RBR	nuc ish (RB1 x 1) [100%]
41. VLNBC	nuc ish (RB1 x 2) [100%]



Até o momento, foram analisados 28 pacientes com tumor de Wilms. Os resultados da análise citogenética molecular dos casos estudados são mostrados na Tabela 22.

Análises por FISH detectaram alterações envolvendo os genes *WT1* e/ou *WT2* em três pacientes (ILSPL, ICCF e NDGS), representando 10,7% dos casos. O paciente ICCF apresentou deleção do gene *WT1* em 100% dos núcleos analisados, possuindo a deleção para a região crítica 11p13. O caso NDGS mostrou a deleção das regiões críticas 11p13 e 11p15, referente aos genes *WT1* e *WT2*, em 75% dos núcleos analisados (Figura 25). Um total de 25 pacientes, ou seja, 89,3% dos casos estudados, não apresentaram a deleção de genes *WT1* e *WT2* (Figura 26). O paciente ILSPL apresentou cópias extras dos genes *WT1* e *WT2* (11p13 e 11p15) detectadas através dessa técnica (Figura 27).

Tabela 21: Resultados da análise citogenética molecular em amostras de tumor de Wilms parafinadas.

Pacientes estudados	Resultados da análise por FISH
1. AMPL	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
2. BNSH	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
3. BOTS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
4. CGS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
5. CS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
6. FSBA	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
7. GBS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
8. ILSPL	nuc ish (WT1 x 3), (WT2 x 3) [100%]
9. IAF	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
10. ICCF	nuc ish (WT1 x 1), (WT2 x 2) [100%]
11. JMS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
12. JES	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
13. JGAS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
14. JRPS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
15. JVBR	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
16. JCES	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
17. LFDm	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
18. LMBT	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
19. MMS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]

20. MJAN	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
21. MLCO	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
22. MVFA	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
23. NDGS	nuc ish (WT1 x 1), (WT2 x 1) [75%] / nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [25%]
24. RCSL	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
25. RWS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
26. RLSS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
27. TEAS	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]
28. YJSP	nuc ish (WT1 x 2), (WT2 x 2) [100%]

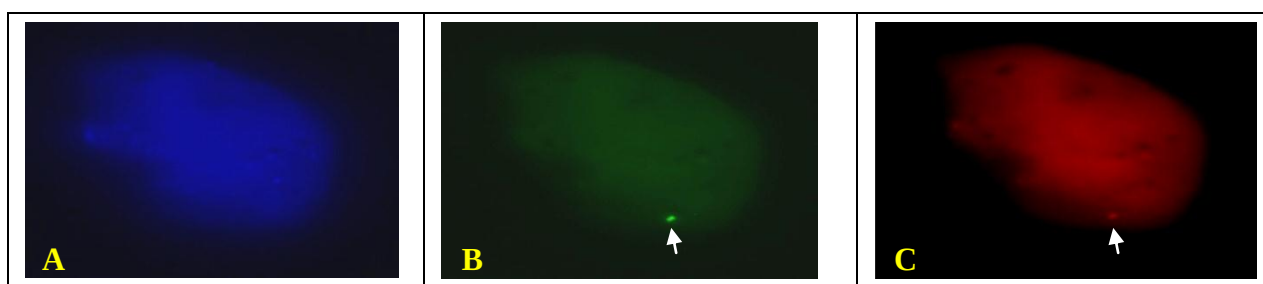


Figura 25: Identificação de uma cópia dos genes *WT1* e *WT2*. A: DAPI. B: FITC. C: Texas Red.

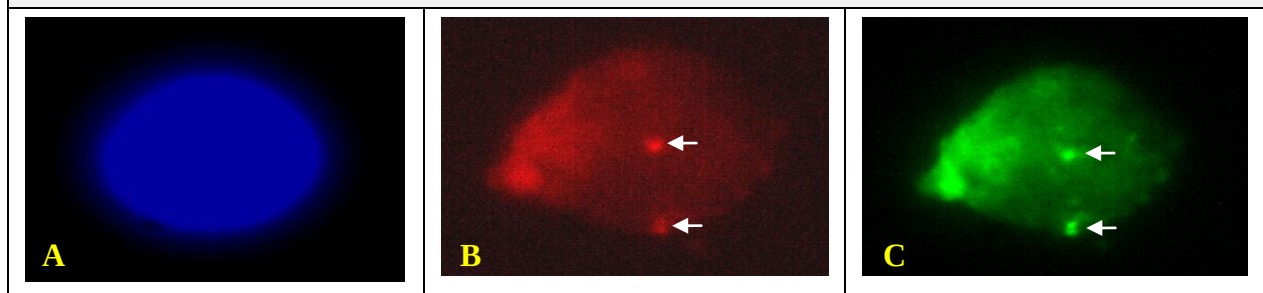


Figura 26: Análise por FISH, identificando duas cópias dos genes *WT1* e *WT2*. A: DAPI. B: Texas Red, C: FITC.

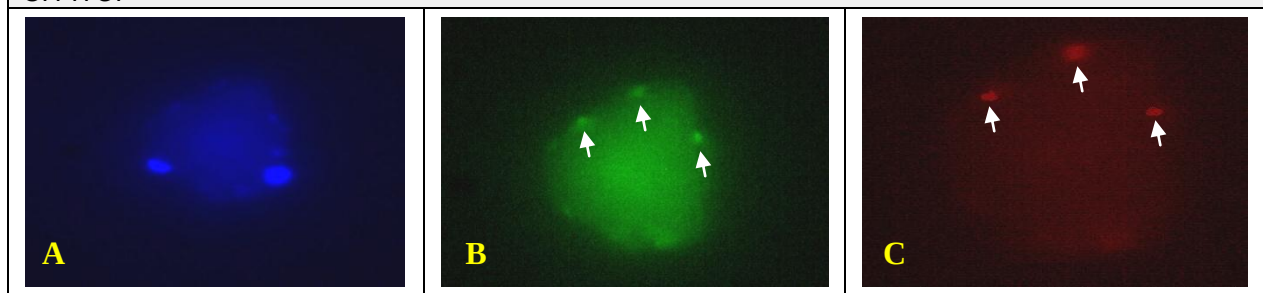


Figura 27: Análises de FISH identificando cópias extras do gene *WT1* e *WT2* no caso ILSP. A: DAPI. B: FITC. C: Texas red.

Em relação ao meduloblastoma, não foi possível realizar análises citogenéticas devido à impossibilidade de localização dos blocos de parafina no Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz.

6. Discussão

Neste estudo foram analisados os principais dados clínicos, dispostos em prontuários médicos, de crianças com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma. As principais variáveis analisadas foram: procedência, sexo, idade, principais sinais e sintomas, local primário do tumor, metástase, estadiamento, parâmetros laboratoriais relevantes, tratamento e estadio. Essas características clínicas foram descritas, o que permitiu avaliar os parâmetros biológicos desses tumores, determinar fatores prognósticos e identificar fatores de risco que influenciaram na sobrevida desses pacientes. Tais informações, além de identificar características locais de apresentação da doença, contribuem para o conhecimento e assistência à criança com câncer no Brasil.

No que diz respeito ao sexo, não foi observado um predomínio do sexo masculino ou feminino em pacientes com neuroblastoma, retinoblastoma e tumor de Wilms. A literatura sugere uma incidência discretamente maior no sexo masculino em pacientes com neuroblastoma (Brodeur e Castleberry, 1993) o que diferiu um pouco dos resultados observados, visto que há um equilíbrio entre os dois gêneros, com um discreto predomínio do sexo feminino em relação ao masculino. Em contrapartida, o equilíbrio entre os dois gêneros visto no estudo do retinoblastoma e tumor de Wilms corrobora com dados anteriores (McClean *et al.*, 2010). A maioria das crianças com meduloblastoma eram do sexo masculino apresentando taxa de sobrevida maior, porém nossos resultados não foram estatisticamente significantes, concordando com Liu *et al.* (2005). Assim, o sexo não pode ser considerado como fator associado à predisposição ao meduloblastoma, retinoblastoma e tumor de Wilms. Contudo, uma maior

sobrevivência para o sexo masculino (49,23%) em relação ao sexo feminino (33,49%) foi observada entre os pacientes com neuroblastoma, sugerindo assim que o sexo pode ser um fator determinante para a evolução dessa malignidade ($p=0,0256$).

A idade média ao diagnóstico dos pacientes com neuroblastoma, retinoblastoma e tumor de Wilms concordam com a literatura, que relata idade inferior a 5 anos em pacientes com neuroblastoma; 2-3 anos em pacientes com retinoblastoma, descrita em países em desenvolvimento; e 5-6 anos para tumor de Wilms. Entretanto, os pacientes com meduloblastoma apresentaram idade ao diagnóstico um pouco superior (9,2 anos) à idade inferior aos 8 anos relatada na literatura. A falta de informação e o baixo nível socioeconômico podem contribuir para o diagnóstico tardio e, consequente doença avançada ao diagnóstico (Cervoni, 1994; Brodeur *et al.*, 2002; Mclean *et al.*, 2010; Lukusa *et al.*, 2012). A idade é considerada fator prognóstico importante para o desenvolvimento de neuroblastoma e meduloblastoma, menores de um ano e maiores de três anos representam bom prognóstico para os respectivos tumores, segundo Katherine *et al.* (1999) e Rondinelli *et al.* (2004). Embora, no presente estudo os pacientes com neuroblastoma menores de um ano e os pacientes com meduloblastoma maiores de três anos tenham apresentado maior sobrevida, a idade não foi um fator prognóstico estatisticamente significativo na determinação da sobrevida de pacientes com neuroblastoma e meduloblastoma.

Os sinais e sintomas frequentemente observados no presente estudo corroboram com a literatura, que relata massas dolorosas, febre e aumento de volume abdominal em pacientes com neuroblastoma (Golden *et al.*, 2002), diminuição da visão e leucocoria no retinoblastoma (Lukasa *et al.*, 2012), dor e

crescimento abdominal no tumor de Wilms (Grundy *et al.*, 2002), e cefaléia, vômito e marcha cambaleante no meduloblastoma (Raffel *et al.*, 2004).

No presente estudo foi avaliada a localização do tumor em pacientes com neuroblastoma e retinoblastoma. Entre os pacientes com neuroblastoma, tumores com localização abdominal foram mais frequentes. Segundo Sung *et al.* (2009), a maioria dos casos de neuroblastoma ocorrem no abdômen, enquanto outras localizações são mais raras. Tumores originados em outros sítios podem apresentar diferentes características clínicas e biológicas, podendo ser prognosticamente importante, por exemplo, tumores do mediastino parecem apresentar curso mais favorável que tumores abdominais (Sung *et al.*, 2009). Em concordância, nesse estudo, os tumores abdominais foram associados a uma sobrevida um pouco inferior àqueles com localização extra-abdominal, no entanto, difere do observado por Cartum *et al.* (2004) e Schwab *et al.* (2000), mas nossos resultados não foram estatisticamente significantes. A localização do tumor também é um fator prognóstico importante em pacientes com retinoblastoma. O presente estudo apontou uma sobrevida significativamente menor para aqueles com doença extraocular. Segundo Sethi *et al.* (2013) e Lukusa *et al.* (2012), uma vez disseminada a neoplasia através da órbita, nervo óptico e sistema nervoso central, as taxas de salvamento ocular e sobrevida são baixas, principalmente em casos de doença avançada instalada ao diagnóstico, quando esse ocorre mais tardiamente.

Um dos fatores prognósticos mais importantes é a extensão da doença ao diagnóstico. A disseminação da doença foi avaliada em pacientes com retinoblastoma e meduloblastoma. No presente estudo observamos que pacientes com retinoblastoma apresentavam infiltração da doença no nervo óptico, medula

óssea e metástases no sistema nervoso central (SNC) com frequências similares às observadas por Alvarado-Castilho *et al.* (2009). Segundo Meel *et al.* (2012), a sobrevida em casos de doença extraocular é menor, exibindo taxas que variam entre 50 e 70%, em contrapartida, pacientes com doença intraocular apresentam sobrevida de 95%. Embora com sobrevida um pouco mais baixa em relação a apresentada por Meel *et al.* (2012), essa correlação também foi estatisticamente significativa nesse trabalho ($p < 0,001$), os pacientes com manifestação extraocular e intraocular apresentaram sobrevida de 42,72% e 79,85%, respectivamente. Quando houve disseminação do tumor em pacientes com meduloblastoma, a sobrevida foi significativamente baixa (28,57%, $p = 0,0350$), comparada à daqueles que apresentaram a doença localizada (59,37%). Isso é descrito pela literatura, já que um dos critérios para definição de meduloblastoma de alto risco é a apresentação metastática da doença no momento do diagnóstico (Ellison *et al.*, 2011). Assim, a extensão da doença pode ser considerada um fator de impacto prognóstico para o retinoblastoma e para o meduloblastoma.

O estadiamento foi avaliado entre os pacientes com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma. Mas não foram considerados estatisticamente significantes quanto à sobrevida para aqueles com tumor de Wilms e meduloblastoma, não apresentando relevância prognóstica, em contradição com os dados apontados por Teixeira *et al.* (2001), Pogorzala *et al.* (2014) e Dufour *et al.* (2012). Entretanto, foi relevante entre os pacientes com neuroblastoma e retinoblastoma. Evans *et al.* (1989) também encontrou relevância na relação entre estadiamento e sobrevida para pacientes com neuroblastoma, e Cartum *et al.* (2004) mostrou o melhor prognóstico para o estágio I nesses pacientes, assim como Weinstein *et al.* (2003), que observou

uma sobrevida maior que 95% para aqueles com estágio I, associando esses dados a uma doença de baixo risco, observando também que baixas taxas de cura estavam associadas àqueles com estágio mais avançado e doença de alto risco. Esses dados estão em concordância com o presente estudo em pacientes com neuroblastoma. A concordância com a literatura também foi observada em pacientes estudados com retinoblastoma. Os estágios avançados e doença extraocular estão relacionados a um pobre prognóstico em pacientes com retinoblastoma, sendo mais comumente observado em casos de diagnóstico tardio (Chantada *et al.*, 1999).

Aumento nos níveis de DHL (>400UI) foi verificado em pacientes com neuroblastoma, com sobrevida de 43,19% ($p = 0,0173$). Segundo a literatura, pacientes com níveis sanguíneos de DHL superiores a 1500 UI ou 2,7 vezes o limite de normalidade (DHL<400UI) estão associados com doença mais agressiva. Em contrapartida, Cartum *et al.* (2004) utilizaram mediana de 428 UI como valor de corte para avaliação estatística e não observaram correlação com pior prognóstico. Entretanto, essa correlação foi estatisticamente significativa nesse trabalho quando foi utilizado o ponto de corte de 400UI, o que indicou que a DHL pode ser um importante marcador que influencia na sobrevida dos pacientes com neuroblastoma, evidenciando uma relação inversa entre nível sérico inicial e sobrevida desde o diagnóstico, somente pacientes com níveis séricos iniciais mais baixos parecem sobreviver por longo período.

Adicionalmente, foi avaliada a hipótese de que os polimorfismos nos genes *MTHFR*, *MTR*, *SLC19A1* e *TYMS*, envolvidos no metabolismo do ácido fólico, influenciariam no risco para desenvolvimento de neuroblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma. Vários estudos epidemiológicos e clínicos concordam

com o conceito que *status* do folato predispõe a carcinogênese (Giovannucci, 2002; Heijmans *et al.*, 2003). A literatura mostra associações entre polimorfismos e cânceres, como o colorretal (Ulvik *et al.*, 2004; Sharp *et al.*, 2004; Ulrich *et al.*, 2005; Guerreiro *et al.*, 2008; Mokarram *et al.*, 2008), o gástrico (Gotze *et al.*, 2007), o carcinoma hepatocelular (Yuan *et al.*, 2007), leucemias (Pereira *et al.*, 2004; Zanrosso *et al.*, 2005; Ramos, 2006), retinoblastoma (De Lima *et al.*, 2010), e tumores do sistema nervoso central (Sirachainan *et al.* 2008).

Entretanto, não foram encontradas associações entre os polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *SLC19A1* e *TYMS* e o risco de desenvolvimento do meduloblastoma. Esses polimorfismos foram analisados em pacientes com tumor de Wilms, e o *MTHFR A1298C* mostrou associação com esse tumor. Não foram detectadas associações entre os polimorfismos *MTHFR*, *MTR* e *TYMS* e o desenvolvimento do neuroblastoma, entretanto, foi observado no presente estudo que o genótipo AA do gene *SLC19A1* confere maior risco de desenvolvimento de neuroblastoma em portadores desse genótipo (Anexo 4). Esses são os primeiros relatos demonstrando a associação entre o *MTHFR A1298C* e o tumor de Wilms, e *SLC19A1 G80A* e o neuroblastoma.

O gene *SLC19A1* codifica o carreador de folato reduzido 1 (RFC1), responsável pela absorção de folato pela célula (Chango *et al.*, 2000). Baixos níveis de folato podem prejudicar os mecanismos de metilação, síntese e reparo de DNA, devido à deficiência do substrato para as enzimas *MTR*, TS e *MTHFR* (Blount *et al.*, 1997, Usmani *et al.*, 1993). Para manter níveis adequados de folato no interior da célula, é necessário que o mecanismo que regula a sua absorção seja extremamente funcional.

Chango *et al.* (2000) reportaram que indivíduos 80AA para o *SLC19A1*, apresentavam níveis plasmáticos mais elevados de folato que aqueles 80GG ($p = 0,02$). Acredita-se que a mudança do aminoácido Arg→His no primeiro domínio transmembrana (TMD1) da proteína, causado pela substituição G80A possa alterar as propriedades de transporte da proteína RFC1. Os efeitos exatos causados pelo polimorfismo genético sobre a proteína são desconhecidos (Whetstone *et al.*, 2001).

De acordo com a literatura, o polimorfismo G80A no gene *SLC19A1* mostrou estar associado com o desenvolvimento de várias doenças, incluindo defeitos do tubo neural (De Marco *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2002; Morin *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2005), câncer esofágico e gástrico (Wang *et al.*, 2006), porém, não foi encontrada associação com câncer de cólon (Kanth *et al.*, 2011) ou linfoma não-Hodgkin (Skibola *et al.*, 2004). Laverdiere *et al.* (2002) relataram que os pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) tratados com metotrexato (MTX), homozigotos ou heterozigotos para o alelo 80A, apresentaram maior risco de ter eventos adversos em relação aos pacientes com o genótipo 80GG, e possuem maiores concentrações plasmáticas de MTX, quando comparados com os genótipos 80GA e 80GG, embora esta associação não esteja ligada à evolução da doença.

Nossos resultados nos levaram a hipótese de que indivíduos 80AA para o gene *SLC19A1* podem apresentar uma má absorção de folato pela célula, o que pode determinar instabilidade genômica ou ativação de protooncogenes, sendo um fator de risco para o desenvolvimento do neuroblastoma. Este efeito é ainda maior durante o desenvolvimento embrionário, onde a necessidade de maior produção de DNA é necessária para manter altas taxas de divisão e diferenciação

celular. Para superar os efeitos da má absorção de ácido fólico pelo RFC1, talvez, doses mais elevadas desta vitamina possam ser oferecidas a mulheres grávidas para suprir a absorção deficiente através do RFC-1 causado pelo polimorfismo, como observado no declínio no número de crianças nascidas com neuroblastoma (French *et al.*, 2003).

Polimorfismos gene *MTHFR* promovem a substituição de alanina para glutamato na enzima, levando a uma redução da atividade enzimática. Essa mutação pode levar à hipometilação e à instabilidade genômica, e, conseqüentemente, à ativação de oncogenes ou à inativação de genes supressores de tumor, como também, à formação de sítios frágeis e quebras cromossômicas (Delboni *et al.*, 2011).

Portanto, esse polimorfismo pode contribuir para o desenvolvimento do processo carcinogênico, sendo frequentemente relacionados a diferentes tipos de câncer, entre outras doenças. Interações entre o processo leucemogênico e o polimorfismo do gene *MTHFR* foram descritos por Pereira *et al.* (2004); Zanrosso *et al.* (2005) e Ramos *et al.*, (2006). O genótipo 1298CC foi associado à diminuição do risco para câncer colorretal (Sharp & Little, 2004). Sirachainan *et al.* (2008) relataram que o homozigoto CC do polimorfismo *MTHFR* A1298C conferiu um risco ao desenvolvimento de tumores embrionários do SNC em crianças tailandesas. Nassiri *et al.* (2013) demonstraram a importância do estudo polimorfismo da *MTHFR* e o desenvolvimento do câncer colorretal. Qi *et al.* (2014) encontraram associação entre o polimorfismo A1298C e o risco de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em uma população chinesa.

Diante disso, pode-se observar que inúmeros são os autores que apontam a associação entre os polimorfismos do gene *MTHFR* e o desenvolvimento de

câncer. Em concordância, o presente estudo demonstrou que há uma associação entre o polimorfismo *A1298C do gene MTHFR* e a ocorrência do tumor de Wilms. Sugerindo, portanto, que indivíduos portadores do alelo C apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento do tumor de Wilms, sendo o genótipo AC um candidato a fator de risco para essa neoplasia.

Contudo, quanto ao estudo de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo do folato, é importante ressaltar que a presença desses polimorfismos não garante o desenvolvimento e patogênese do tumor, mas podem ser indicadores de risco adicional para o desenvolvimento da doença.

Os polimorfismos de genes envolvidos na via de folato são freqüentemente associados com a susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer (Sharp, 2004). Além disso, nestes últimos anos tem sido amplamente discutida a influência de polimorfismos na resposta clínica à quimioterapia e toxicidade, sendo considerado fator prognóstico importante para o câncer (Biolo *et al.*, 2004).

Chen *et al.* (2003) mostraram que polimorfismo em *TYMS* pode modificar o risco e a sobrevivência de câncer colorretal. Matakidou *et al* (2007) descrevem que não há evidências de que a variação dos genes do metabolismo de folato possa influenciar o prognóstico de câncer de pulmão. Eissa *et al.* (2013) descreveram o efeito dos polimorfismos C677T e A1298C na toxicidade relacionada com metotrexato em leucemia linfoblástica aguda e sugerem que o polimorfismo *MTHFR* seja um predictor importante de toxicidade relacionado com o MTX, considerando-o um potencial fator prognóstico que influenciam no desfecho da doença. Radtke *et al.* (2013) apresentaram essa variação genética em genes candidatos da via MTX/folato e concluíram que as variações genéticas influenciam substancialmente a cinética de resposta à terapia com altas doses do

MTX na leucemia linfoblástica aguda da infância. D'Àngelo *et al.* (2013) mostraram a influência de polimorfismos do gene *MTHFR* em pacientes pediátricos com linfoma não-Hodgkin tratados com altas doses de metotrexato.

No entanto, o presente estudo é o primeiro a investigar a associação do polimorfismo *MTHFR C677T e A1298C*, *MTR A2756G*, *TYMS 2R3R* e *SLC19A1 G80A* na sobrevida de pacientes com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de wilms e meduloblastoma. Foram observadas discretas diferenças nas taxas de sobrevida global entre os genótipos dos pacientes estudados para cada tumor. Embora sejam observadas diferenças discretas nas taxas de sobrevivência, nossos resultados não foram estatisticamente significantes.

A análise da influência dos alelos para um pior prognóstico e sobrevivência foi realizadas em pacientes com NB, RB, TW e MB. Os resultados obtidos mostraram que alelos mutantes e selvagens para os polimorfismos estudados não estão associados a um pior prognóstico e nem a uma menor taxa de sobrevivência em pacientes com NB, RB, TW e MB, de forma estatisticamente significativa. No entanto, apenas o alelo *MTR 2756A* parece contribuir para uma menor sobrevida em pacientes com RB, de forma estatisticamente significativa ($p=0,0207$) (Figura 18 e Anexo 3).

A enzima metionina sintase, produto do gene *MTR*, é essencial na manutenção de metionina e ácido fólico intracelular, bem como para garantir que as concentrações de homocisteína para não alcançar níveis tóxicos. A enzima catalisa uma remetilação da homocisteína para metionina através do uso de metilcobalamina (vitamina B12) e 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), que atuam como doadores de grupos metil nesta reação (Van Der Put *et al.*, 1997). O polimorfismo *MTR A2756G* leva à redução da atividade da MTR (Ding *et al.*, 2013;

Zhao et al., 2013). Então, a presença do polimorfismo provavelmente causa um acúmulo do substrato para a enzima e deficiência do produto (necessário para a biossíntese de timidilatos), bem como o aumento do nível de homocisteína, fundamental para a manutenção do nível intracelular de S-adenosilmetionina para metilação de DNA e efeito supressor de câncer (De Lima et al. 2010; Hosseini et al., 2013).

Os resultados obtidos no presente trabalho estão em concordância com De Lima et al. (2010), que apresenta uma evidência preliminar para associação entre o polimorfismo do gene *MTR* e a susceptibilidade ao retinoblastoma em uma população brasileira. Adicionalmente, Sarbia et al. (2006) apresenta resultados similares que mostraram que tumores com o genótipo do tipo selvagem *MTR* (2756AA) apresentaram um tempo de sobrevida média de 16 meses, enquanto que tumores com um genótipo variante *MTR* (2756AG e 2756GG) mostraram um tempo de sobrevida média de 42 meses ($p= 0.0463$). Isto sugere que o impacto prognóstico pode ser verificado para a presença do alelo 2756A.

Entretanto, o impacto funcional do polimorfismo *MTR* G2756A não está bem estabelecido, sendo ainda controverso (Ding et al., 2013; Hosseini et al., 2013). Alguns autores sugerem que indivíduos que possuem o genótipo 2756GG apresentam um menor nível de homocisteína no plasma em relação aos indivíduos com 2756AA, o que indica um aumento da atividade enzimática na presença do genótipo variante, levando à hipótese que este polimorfismo pode ter um efeito ativador da enzima que favorece a conversão da homocisteína a metionina (Paz et al., 2002; Sarbia et al., 2006; Ding et al., 2013). Contudo, existem evidências de que a presença do genótipo variante esteja associada a uma deficiência da atividade enzimática, causando elevação dos níveis de

homocisteína e hipometilação do DNA (Leclerc *et al.*, 1996; Hosseini *et al.*, 2013; Niedzielska *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Portanto, novas investigações são necessárias para avaliar o potencial efeito do polimorfismo *MTR* A2756G em relação à sobrevida de pacientes com RB.

Evidências de significado prognóstico e melhor entendimento da doença também foram obtidos através de estudo citogenético. Dois casos de Neuroblastoma exibiram alterações já relatadas na literatura para esse tipo de malignidade, envolvendo os cromossomos 1, 2 e 17, onde estão localizados os genes *n-myc*, *Tp53* e a região 1p36, frequentemente associadas ao desenvolvimento de Neuroblastoma (Stigliani *et al.*, 2012). Um caso de retinoblastoma cultivado com sucesso revelou um caso atípico de uma criança com Rb com aberrações cromossômicas comuns para o retinoblastoma, como del(13q), i(6p), +1, e monossomia 16, além de outras ainda não descritas, incluindo dup(5q), dic(15;22) e add(14q), associadas a gravidade da doença. (Anexo 5).

A fixação de tecidos em parafina é um método prático e eficiente para sua preservação, mas resulta no enovelamento de proteínas nucleares, na formação de ligações entre proteínas e DNA e na fragmentação do DNA, o que dificulta a extração e análise dessa classe de moléculas para estudos genéticos (Simonato *et al.*, 2007). Por esse motivo se faz necessário à utilização de uma técnica de desparafinização eficaz. As técnicas de extração de tecido tumoral armazenados em blocos de parafina e FISH vêm sendo utilizadas com êxito no Laboratório de Citogenética do CEONHPE/HUOC/UPE.

A utilização da FISH como método diagnóstico representou um grande avanço na citogenética, visto que essa técnica permite a identificação das

anormalidades cromossômicas diretamente em células em intérfase, obtidas a partir de suspensões, de tecido congelado ou fixado e inclusas em parafina, além da análise em preparações cromossômicas (Kebriaei *et al.*, 2003), extremamente úteis em dadas situações clínico-laboratoriais limítrofes (Sugayama *et al.*, 2000). Assim, através dessa metodologia é possível obter evidências de significado prognóstico, bem como o melhor entendimento da doença.

Foram analisadas 10 amostras de neuroblastoma, 41 de retinoblastoma e 28 de tumor de Wilms. Através da técnica de FISH foi possível detectar amplificação do gene *n-myc* em três casos de neuroblastoma. A amplificação do gene *n-myc* é indicativo de mal prognóstico em pacientes com essa neoplasia (Stigliani *et al.*, 2012). Em retinoblastoma, a análise por FISH revelou que 26,83% dos pacientes apresentavam a deleção do gene *RB1*. Segundo Yun *et al.* (2011), uma proporção importante de pacientes apresentam alterações envolvendo o cromossomo 13 (13q14). Cerca de 20% dos Retinoblastomas apresentam deleções na região 13q14 ou monossomia do cromossomo 13, corroborando com os resultados observados no presente estudo.

Dos pacientes que apresentaram a deleção, 60% foram do tipo bilateral, relacionando, possivelmente, a deleção com a forma hereditária da doença. Dos pacientes sem a deleção, em 69% dos casos o tumor se manifestou de forma unilateral, relacionando assim a presença de duas cópias do gene com uma possível forma esporádica da doença, como descrevem Mohammed *et al.* (2009), Little *et al.* (2011), Torres e Erwenne (2012). No presente estudo, entre os casos que apresentaram deleção, 70% estão vivos sem a doença e apenas 30% foram a óbito. Dessa forma, a deleção do *RB1* pode não ser considerada um fator que determine pior prognóstico em crianças com Retinoblastoma.

Quanto à análise citogenética molecular do tumor de Wilms, foi estudada a deleção dos genes *WT1* e *WT2*. Embora pacientes com tumor de Wilms representem um grupo com uma sobrevivência livre de doença maior, a presença da deleção do gene *WT1* e a perda da heterozigosidade do *WT2* no tumor de Wilms são cada vez mais demonstradas exercendo influencia no desenvolvimento da doença (Scott *et al.*, 2012). No presente estudo, a deleção dos genes *WT1* ou *WT2* foi evidenciada em 10,7% dos casos e esses dados podem ajudar na estratificação clínica do tumor de Wilms. A estratificação de tumores em estudos clínicos permite a avaliação destas associações em grande número de dados, e irá provavelmente resultar em maiores avanços na nossa compreensão dos processos moleculares que resultam no tumor de Wilms e suas manifestações clínicas (Scott *et al.*, 2012). Além disso, uma maior compreensão dessas e de outras alterações genéticas fornecerá fundamentação para novos alvos terapêuticos para tumor de Wilms (Spreafico and Bellani *et al.*, 2006).

Outras alterações têm sido associadas com o desenvolvimento do tumor de Wilms, como a dissomia uniparental paterna e duplicação, observada em casos esporádicos de tumor de Wilms (Gadd *et al.*, 2012). A presença de dissomia paterna e duplicação poderia justificar a presença de três sinais observados no caso ILSPL. Entretanto, mais estudos são necessários para essa afirmação. Uma análise abrangente para detectar estas anomalias é requerida utilizando grandes quantidades da amostra do tumor e ensaios múltiplos, tecnicamente exigentes, difíceis em condições limitadas de amostras de tumor fixado em parafina.

Os resultados obtidos nesse trabalho podem ser o reflexo das condições de assistência à saúde, situação socioeconômica e/ou fatores genéticos. É

importante que novos estudos sejam realizados no intuito de avaliar o impacto dessas variáveis no tratamento das crianças com câncer, uma vez que há relatos na literatura de crianças de países em desenvolvimento, quando expostas às condições ideais de tratamento, apresentam resultados semelhantes àqueles de países desenvolvidos.

7. Conclusões

A análise de dados clínicos, moleculares e citogenéticos em crianças com neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms e meduloblastoma permitiu determinar fatores prognósticos e identificar fatores de risco que influenciaram na sobrevida desses pacientes.

O sexo feminino, o estadiamento e níveis de DHL contribuíram de forma estatisticamente significativa para a evolução do neuroblastoma. Adicionalmente, o genótipo AA do gene *SLC19A1* (G80A) conferiu uma maior predisposição ao desenvolvimento da doença em portadores deste genótipo. A amplificação do gene *n-myc* foi observada em 30% dos pacientes com esse tumor, sendo indicativo de mal prognóstico.

No que diz respeito ao retinoblastoma, a disseminação da doença, o estadiamento e a presença do alelo *MTR* 2756A estão associados a uma menor sobrevida em portadores da neoplasia.

Foi observada a associação do alelo C do polimorfismo do gene *MTHFR* A1298C em relação ao desenvolvimento do tumor de Wilms, conferindo uma maior predisposição ao desenvolvimento da doença em portadores deste alelo. Além disso, deleções nos genes *WT1* e *WT2* foram evidenciadas em 10,7% dos casos estudados de tumor de Wilms, demonstrando importância no desenvolvimento da doença.

O sexo feminino representou pior prognóstico em crianças com meduloblastoma. Contudo, a disseminação da doença e recidivas foram estatisticamente relevantes quanto à sobrevida dos portadores do meduloblastoma, sendo indicativo de mau prognóstico.

Os resultados encontrados no presente estudo contribuem para o conhecimento e assistência às crianças com câncer no Brasil, além de auxiliar na identificação de características dos tumores sólidos na infância. Entretanto, novos estudos são necessários para avaliar o impacto dessas variáveis no tratamento de crianças com câncer.

8. Referências

- Abbaszadeh F; Barker KT; Mcconville C; Scott RH; Rahman N. (2010) A new familial cancer syndrome including predisposition to Wilms tumor and neuroblastoma. *Familial Câncer*, 2010. Published online.
- Aerts I, Rouic LL, Gauthier-Villars M, Brisse H, Doz F and Desjardins L (2006) Retinoblastoma. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 1(31):1-11
- Albright AL, Adelson PD, Pollack IF (2008) Principles and Practice of pediatric neurosurgery. Ed Thieme. 2º Ed.
- Albright AL, Wisoff JH, Neltzer MD, Boyett J, Rorke LB and Stanley P (1996). Effects of medulloblastoma resections on outcome in children: A report from the children's cancer group. *Journal of Neurosurgery*, 38(2):265-271
- Aldosari N, Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Bigner DD (2000) Bigner SH. Characterization of chromosome 17 abnormalities in medulloblastomas. *Acta Neuropathol*. 2000;99(4):345–351.
- Alvarado-Castillo B, Campos-Campos LE, Villavicencio-Torres A. (2009) Clinical and metastatic characteristics in retinoblastoma. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 47(2):151-6.
- Amare Kadam PS, Ghule P, Jose J, Bamne M, Kurkure P, Banavali S, Sarin R, Advani S (2004) Constitutional genomic instability, chromosome aberrations in tumor cells and retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1;150(1):33-43.
- Araujo OR, Trindade KM, Trompiera NM, Fontenele JB, Felix FHC (2011) Analysis of survival and prognostic factors of pediatric patients with brain tumor. *Jornal de Pediatria - Vol. 87, Nº 5*
- Argollo N and Lessa, I (1999) Aspectos clínico-epidemiológicos das neoplasias cerebrais na faixa etária pediátrica no Estado da Bahia, Brasil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 57(2b).
- Attiyeh, EF, London, WB, Mosse, YP, Wang, Q, Winter, C, Khazi, McGrady, PW, Seeger, RC, Look, AT, Shimada, H, Brodeur, GM, Cohn SL, Matthay, KK and Maris, JM. (2005) Chromosome 1p and 11q Deletions and Outcome in Neuroblastoma. *N Engl J Med* 353:2243-53.
- Austruy E, Cohen-Salmon M, Antignac C, Bérout C, Henry I, Cong NV, Brugieres L, Junien C and Jeanpierre (1993) Isolation of Kidney Complementary DNAs Down-expressed in Wilms' Tumor by a Subtractive Hybridization Approach. *Cancer Research*. 53:2888-2894.
- Ayusawa D; Koyama H; Shimizu K; Kaneda S; Takeishi k; SENO T.(1986) Induction, by thymidylate stress, of genetic recombination as evidenced by deletion of a transferred genetic marker in mouse FM3A cells. *Molecular and cellular biology*. 6: 3463-3469.
- Balmer A, Zografos L and Munier F (2006) Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene* 25. 5341-5349.
- Baluz K, Carmo MGT and Rosas G(2002) The role of folic acid on oncologic prevention and intervention: review. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 48(4): 597-607.
- Barros JEXS, Soares-Ventura EM, Santos N, Amaral BAS, Oliveir FM, Vera Cruz RS, Morais VLL, Marques-Salles TJ and Muniz MTC (2012) New cytogenetic

- aberrations found in a case of aggressive retinoblastoma. *Genetics and Molecular Research* 11(2): 1666-1670.
- Basta-Jovanovic G, Radojevic-Skodric S, Brasanac D, Djuricic S, Milasin J, Bogdanovic L, Opric D, Savin M, Baralic I, Jovanovic M (2012) Prognostic value of survivin expression in Wilms tumor. *J BUON*. 17(1):168-73.
- Belcher, S (2009) Blockade of estrogen receptor signaling to improve outlook for medulloblastoma sufferers. *Future of Oncology*. 5(6): 751-754.
- Bertoldi AR, Gonçalves B, Carv TS (2012) Importance of Red Reflex Test Inclusion on Children Examination Protocol for Retinoblastoma Early Diagnosis. *Revista Ciências em Saúde*. 2(3):1-12.
- Biegel JA, Rorke LB, Packer RJ, Sutton LN, Schut L, Bonner K, Emanuel BS. (1989) Isochromosome 17q in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Chromosomes Cancer*. 1(2):139-47.
- Biolo A, Rohde LE (2004) O impacto dos polimorfismos genéticos e da farmacogenética na avaliação e manejo da insuficiência cardíaca. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul - Ano XIII nº 03 Set/Out/Nov/Dez 2004*
- Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL et al. (2008) Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res*. 7:33-42.
- Biselli PM, Guerzoni AR, Goloni-Bertollo EM, Godoy MF, Abou-Chahla JAB, Pavarino-Bertelli EC (2009) Variabilidade genética mthfr no desenvolvimento da doença arterial coronária. *Rev Assoc Med Bras*. 55(3): 274-8.
- Blount BC; Mack MM; Wehr CM; Macgregor JT; Hiatt RA; Wang G; Wickramasinghe SN; Everson RB; Ames BN. (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 3290-3295.
- Bown N, Cotterill SJ, Roberts P, et al. Cytogenetic Abnormalities and clinical outcome in Wilms Tumor: a study by the U.K. Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38:11-21.
- Brandalise SR (2007) Acute lymphoblastic leukemia in children. *Arch Med Intern*. Supl 1; 29: S92-S5.
- Brodeur GM, Castleberry RP (1993) Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 2nd edition. Philadelphia: J. B. Lippincott; p. 739-68, 1993.
- Brodeur GM, Maris JM (2002) Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG (ed). *Principles and practice of pediatric oncology*, 4th edn. Philadelphia, 865-937. Butrus et al., 2002
- Cai RQ, Zhou CJ, Sun QN, Ma XL, Wang M, Li Y, Wang DY, Gong LP (2013) Molecular genetic abnormalities of N-myc and C-myc in pediatric neuroblastic tumors and clinical pathologic significance. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 42(5):299-304.
- Candelaria M, Taja-Chayeb L, Arce-Salinas C et al. (2005) Genetic determinants of cancer drug efficacy and toxicity: practical considerations and perspectives. *Anti-Cancer Drugs*. 16:923-933.
- Carmel R and Jacobsen DW (2001) *Homocysteine in health and disease*. Cambridge University Press.

- Caro J (2007) Cobalamin and megaloblastic anemias: overview. In: Lichtman MA, Beutler E *et al.* (Ed). *Williams Hematology*. Seventh. New York: McGrawHill, Inc., cap 39.
- Caroline Laverdière, Sonia Chiasson, Irina Costea, Albert Moghrabi, and Maja Krajinovic (2002) Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 100 (10): 3831-3834.
- Carr MC; Mitchell ME (2005) Chapter 46: Neuroblastoma. *Urologic Oncology*, 739-752.
- Cartum J, Cristófani LM, Bendit I, Odone Filho V. (2004) Clinical features, treatment and prognostic variables in children older than one year with non-disseminated neuroblastoma. *Pediatrics*. 26(3): 159-171.
- Castleberry RP (1997) Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatric Clinics of North America*. 44(4): 919-937.
- Castro R, Rivera I, Ravasco P *et al.* (2003) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *QJM*. 96:297-303.
- Cervoni, L; Maleci, A; Salvati, M; Delfini, R; Cantore, G. (1994) Medulloblastoma in late adults: report of two cases and critical review of the literature. *Journal of Neuro-Oncology*. N. 19, P. 169 – 173.
- Chang CH, Housepian EM, Herbert Cjr. (1969) An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas. *Radiology*; 93, 1351-69.
- Chango A, Emery-Fillon N, Courcy GP *et al* (2000) A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 70: 310–315.
- Chantada G, Doz F, Antoneli CB, Grundy R, Clare Stannard FF, Dunkel IJ, Grabowski E, Leal-Leal C, Rodriguez-Galindo C, Schwartzman E, Popovic MB, Kremens B, Meadows AT and Zucker JM (2006) A proposal for an international retinoblastoma staging system. *Pediatric Blood Cancer* 47(6):801-805.
- Chantada G, Fandiño A, Manzitti J, Urrutia L and Schwartzman E (1999) Late diagnosis of retinoblastoma in a developing Country. *Arch Dis Child* 80:171–174
- Chauffaille MLLF; Figueiredo MS; Beltrani, R; Antunes, SV; Yamamoto, M; Kerbaux, J. (2001) Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetic techniques. *Braz J Med Biol Res*, 34:735-743.
- Chen J, Hunter DJ, Stampfer MJ, *et al.* (2003) Polymorphism in the Thymidylate Synthase Promoter Enhancer Region Modifies the Risk and Survival of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:958-962.
- Chen K, Song L, Jin MJ, Fan CH, Jiang QT, Yu WP (2006) Association between genetic polymorphisms in folate metabolic enzyme genes and colorectal cancer: a nested case-control study. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 28(6):429-32.
- Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B (1997) Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem*. 272:3628-34.

- Chintagumpala M, Chevez-Barrios P, Paysse E, Plon SE, Hurwitz R (2007) Retinoblastoma: Review of Current Management. *Pediatric Oncology*.12:1237–1246.
- Coco S, Valdora F, Bonassi S, Scaruffi P, Stigliani S, Oberthuer A, Berthold F, Andolfo I, Servidei T, Riccardi R, Basso E, Iolascon A and Tonini GP (2011) Chromosome 9q and 16q loss identified by genome-wide pooled-analysis are associated with tumor aggressiveness in patients with classic medulloblastoma. *OMICS*.15(5):273-80.
- Collin SM, Metcalfe C, Zuccolo L *et al.* (2009) Association of Folate-Pathway Gene Polymorphisms with the Risk of Prostate Cancer: a Population-Based Nested Case-Control Study, Systematic Review, and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(9): 2527-2540.
- Conacci-Sorrell M and Eisenman RN (2011) Post-translational control of Myc function during differentiation. *Cell Cycle*. 15;10(4).
- Coppes MJ, Campbell CE and Williams BRG (1993) The role of WT1 in Wilms tumorigenesis. *FASEB j* 7: 886-895.
- Coppes MJ, Haber DA and Grundy PE (1999) Genetic events in the development of Wilms tumor.
- Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ (2007) Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol*. 6:1073-1085.
- Crider-Miller SJ, Reid LH, Higgins MJ, Nowak NJ, Shows TB, Futreal PA, Weissman BE. Novel transcribed sequences within the BWS/WT2 region in 11p15.5: tissue-specific expression correlates with cancer type. *Genomics* 15; 46(3):355-63 (1997).
- Da Fonte MVM, Amaral RPG, Costa MOR, Otaduy MCG, Lucato LT, Reed UC, Rosemberg S and Leite CC (2008) Medulloblastoma: correlation among findings of conventional magnetic resonance imaging, diffusion-weighted imaging and proton magnetic resonance spectroscopy. *Radiol Bras*. 2008 Nov/Dez;41(6):373–378.
- D'Angelo V, Ramaglia M, Iannotta A, Francese M, Pota E, Affinita MC, Pecoraro G, Indolfi C, Di Martino M, Di Pinto D, Buffardi S, Poggi V, Indolfi P, Casale F (2013) Influence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on the outcome of pediatric patients with non-Hodgkin lymphoma treated with high-dose methotrexate. *Leuk Lymphoma*. 54(12):2639-44.
- Das RN, Chatterjee U, Sinha SK, Ray AK, Saha K and Banerjee S (2012) Indian J Med Paediatr Oncol. 2012 Apr-Jun; 33(2):102–106.
- De Lima ELS; Silva VC; Da Silva HA; Bezerra AM; Morais VLL; Morais AL; Santa Cruz R; Hassan R; Barros MHM; De Freitas AC; Muniz MTC. (2010) MTR polymorphic variant A2756G and retinoblastoma risk in Brazilian children. *Pediatric Blood and Cancer*, 54:904-908.
- De Marco P, Calevo MG, Moroni A *et al* (2001) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs. *Eur J Pediatr Surg* 11: S14-S17.
- De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Merello E, Raso A, Finnell RH, Zhu H, Andreussi L, Cama A and Capra V (2003) Reduced folate carrier polymorphism (80A>G) and neural tube defects. *Eur J Hum Genet* 11(3): 245-252.
- Delboni FR, Rodrigues AAN, Alcadipani FAMC, Bianco B, Oliveira KC, Lipay MVN (2011) Association of polymorphisms C677t and A1298c Mthfr gene and the

- occurrence of tumors of head and neck region of Jundiai, São Paulo, Brazil. *Perspectivas Médicas*, 22(2): 21-27.
- Ding W, Zhou D., Jiang X and Lu L (2009) Methionine Synthase A2756G Polymorphism and Risk of Colorectal Adenoma and Cancer: Evidence Based on 27 Studies. *Plos One*. 8(4):1-7.
- Dome JS and Coppes MJ (2002) Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr*. 14:5-11.
- Dome JS and Huff V (2003) Wilms Tumor Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K, editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013.
- Domingo-Fernandez R, Watters K, Piskareva O, Stallings RL, Bray I. (2013) The role of genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma disease pathogenesis. *Pediatr Surg Int*. 29(2):101-19.
- Donaldson SS, Egloert P, Newsham I *et al.* (1997) Retinoblastoma. In: Pizzo P, Poplack D, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 3^a ed. Philadelphia: JB Lippincott. 669-716.
- Dufour C, Beaugrand A, Pizer B, Micheli J, Aubelle MS, Fourcade A, Couanet D, Laplanche A, Kalifa C and Grill J (2012) Metastatic Medulloblastoma in Childhood: Chang's Classification Revisited. *International Journal of Surgical Oncology*. 6p.
- Eissa DS, Ahmed TM (2013) C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: effect on methotrexate-related toxicity in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 24(2):181-8.
- Ellison DW, Kocak M, Dalton J, Megahed H, Lusher ME, Ryan SL, Zhao W, Nicholson SL, Taylor RE, Bailey S, Clifford SC. (2011) Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *J Clin Oncol*. 29(11), 1400-1407.
- Etheredge AJ, Finnell RH, Carmichael SL, Lammer EJ, Zhu H, Mitchell LE and Shaw GM (2012) Maternal and Infant Gene-Folate Interactions and the Risk of Neural Tube Defects. *Am J Med Genet A*. 2012 October ; 158A(10): 2439–2446.
- Evans A E, Anderson JR, Lefkowitz-Boudreaux IB and Finlay JL (1996) Adjuvant Chemotherapy of Childhood Posterior Fossa Ependymoma: Cranio-Spinal irradiation with or Without Adjuvant CCNU, Vincristine and Prednisone: A children Cancer Group Study. *Medical and Pediatric Oncology*, 27: 8-14.
- Ferrara M, Capozzi L and Russo R (2009) Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of Wilms tumor case-control study. *Pediatr Hematol Oncol* 31(4): 256-258.
- Ferreira, RM (1999) Tumores do sistema nervoso central: fatores prognósticos relacionados à sobrevida em crianças e adolescentes em duas coortes. Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro. 183 f.
- Fillon-Emery N, Chango A, Mircher C, *et al.* (2004) Homocysteine concentrations in adults with trisomy 21: effect of B vitamins and genetic polymorphisms. *Am J Clin Nutr*. 80(6): 1551-7.
- Franceschi S, Parpinel M, La Vecchia C, Favero A, Talamini R, Negri E. (1998) Role of different types of vegetables and fruit in the prevention of cancer of the colon, rectum and breast. *Epidemiology*. 9(3):338-41.

- Franco CMR; Malheiros SMF; Gabbai AA. (1999) Meduloblastoma em Adultos. Rev. Neurociências. 7(3):129-135.
- French AE, Grant R, Weitzman S *et al* (2003) Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. Clin Pharmacol Ther 74 (3): 288-294.
- Frosst P; Blom HJ; Milos R; Goyette P; *et al.* (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet. 10(1):111-3.
- Fukuzawa R and Reeve AE (2007) Molecular pathology and epidemiology of nephrogenic rests and Wilms tumors. J Pediatr Hematol Oncol. 29:589-94.
- Gadd S, Huff V, Huang C, Ruteshouser EC *et al.* (2012). Clinically Relevant Subsets Identified by Gene Expression Patterns Support a Revised Ontogenic Model of Wilms Tumor: A Children's Oncology Group Study. Neoplasia 14: 742-756.
- Gajjar A, Hernan R, Kocak M, Fuller C, Lee Y, McKinnon PJ, Wallace D, Lau C, Chintagumpala M, Ashley DM, Kellie SJ, Kun L and Gilberts RJ (1997) Clinical, Histopathologic, and Molecular Markers of Prognosis: Toward a New Disease Risk Stratification System for Medulloblastoma. J Clin Oncol 22:984-993.
- Galbiatti ALS, Ruiz MT, Biselli-Chicote PM, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC (2010) 5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase gene polymorphism (MTR) and risk of head and neck cancer. Braz J Med Biol Res. 43:445-50.
- Galbiatti ALS, Ruiz MTG, Maniglia JV, Raposo LS, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM (2012) Câncer de cabeça e pescoço: polimorfismos genéticos e metabolismo do folato. Rev.Otorrinolaringologia 78(1):132-139.
- Gibas M; Gibas Z; Sandberg AA. (1984) Technical aspects of cytogenetic analysis of human solid tumors. Karyogram. 10: 25-27.
- Gilbertson RJ. (2002) Medulloblastoma: signalling a change in treatment. Lancet Oncol 2004;5:209-18.
- Giovannetti E, Ugrasena DG, Eddy Supriyadi E, Vroling L *et al* (2008) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and thymidylate synthase promoter (TSER) polymorphisms in Indonesian children with and without leukemia, Leukemia Research 32:19-24.
- Giovannucci E. (2002) Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: A review. J Nutr; 132:2350S-2355S.
- Goode EL; Potter JD; Bigler J; Ulrich CM. (2004) Methionine synthase D919G polymorphism, folate metabolism and colorectal adenoma risk. Cancer epidemiology: Biomarkers & Prevention,13:157-162.
- Gotze T, Rocken C, Rohl FW, *et al.* (2007) Gene polymorphisms of folate metabolizing enzymes and the risk of gastric cancer. Cancer Lett;251:228-236.
- Gratias EJ, Jennings LJ, Anderson JR, Dome JS, Grundy P, Perlman EJ (2013) Gain of 1q is associated with inferior event-free and overall survival in patients with favorable histology Wilms tumor: a report from the Children's Oncology Group. Cancer. 1;119(21):3887-94.
- Green DM (2004) The Treatment of Stages I-IV Favorable Histology Wilms' Tumor. Journal of Clinical Oncology. 22(8):1366-1372.
- Green DM, D'Angio GJ, Beckwith JB, *et al* (1996) Wilms tumor. CA Cancer J Clin. 46:46-63.

- Green R (2010) Folate, cobalamin and megaloblastic anemias. In: (Ed) 2010.
- Grundy PE, Green DM, Coppes MJ, Breslow NE, *et al.* (2002) Renal tumors In Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and practice of pediatric oncology. 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 865-93.
- Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML (1999) The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nature Structural Biology*. 6:359 – 65.
- Guerreiro CS, Carmona B, ALVES S, *et al.* (2008) Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients. *Am J Clin Nutr* 88:1413–1418.
- Harmon BE, Friedman K, Nemesure B, Singh M. (2011) Pediatric solid malignant neoplasms: A comparative analysis. *Indian Journal of Pathology & Microbiology* 54 (3) 514-519
- Hayashi H, Tazoe Y, Tsuboi S, Horino M *et al* (2013) A single nucleotide polymorphism of reduced folate carrier 1 predicts methotrexate efficacy in Japanese patients with Rheumatoid Arthritis. *Drug Metab. Pharmacol* 28(2):164-168.
- Heidman RL, Packer RJ, Albright LA, Freeman CR and Rorke LB (1997). Tumors of the Central Nervous System. In; Pizzo P. & Poplack M. D., Principles and Practice of Pediatric Oncology, pp 633-697, Philadelphia, Third Edition. Ed Lippincott Company.
- Heijmans BT, Boer JMA, Suchiman HED, Cornelisse CJ, Westendorp RGJ, Kromhout D, *et al.* (2003) A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Res*.63:1249-53.
- Herkenhoff ME; Backes RG; Gaulke R and Remualdo VR (2012) Genotype frequency in MTHFR samples to C677T polymorphism in patients from the city of Curitiba-PR. *Bras Patol Med Lab*. 48(6)435-438.
- Hishida A; Matsuo K; Hamajima N; Ito H, *et al.* (2003) Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica*. 88:159-166.
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. (1995) Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct*.20:191-7.
- Hosseini M (2013) Role of polymorphism of methyltetrahydrofolatehomocysteine methyltransferase (mtr) a2756g and breast cancer risk. *Pol J Pathol*. 64 (3): 191-195.
- Hou Z and Matherly LH (2009) Oligomeric Structure of the Human Reduced Folate Carrier. *Journal of Biological Chemistry*. 284 (5): 3285–3293.
- Houston SK, Lampidis TJ, Murray TG. (2013) Models and discovery strategies for new therapies of retinoblastoma. *Expert Opin Drug Discov*.
- Hresko RC; kruse M; Strube M; Mueckler M (1994) Topology of the Glut 1 glucose c transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. *J Biol Chem*. 269: 20482-20695.
- Hui W, Ying S, Ning S, Ye-ping J, Ming-lei LI and Lin S. (2012) Identification and analysis of mutations in WTX and WT1 genes in peripheral blood and tumor

- tissue of children with Wilms' tumor. Chinese Medical Journal 125(10):1733-1739.
- Huse JT and Holland EC (2010) Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nature Reviews Cancer. 10:1-13.
- ISCN. An International System for human cytogenetic nomenclature (2005) Cytogenetic & Genome Research. Editors: Shaffer, L.G. and Tommerup N. Ed Karger.
- Jacob J; Frampton AE; Castellano L *et al.* (2012) Retinoblastoma protein determines aggressiveness in triple-negative breast cancer, Expert Rev Anticancer Ther. 12(5):581-4.
- Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, Vermeulen J, Couturier J, Peuchmaur M, Valent A, Plantaz D, Rubie D, Valteau-Couanet D, Thomas C, Combaret V, Rousseau R, Eggert A, Michon J, Speleman F and Delattre O (2009) Overall Genomic Pattern Is a Predictor of Outcome in Neuroblastoma. Journal of clinical oncology. 27(7): 1026-1033.
- Johnson WG; Scholl TO; Spychala JR; Buyske S; *et al* (2005). Common dihydrofolate reductase 19–base pair deletion allele: a novel risk factor for preterm delivery. Am J Clin Nutr. 81: 664 – 668.
- Kanaan N, Marti S, Moliner V *et al* (2009) QM/MM Study of Thymidylate Synthase: Enzymatic Motions and the Temperature Dependence of the Rate Limiting Step. J Phys Chem. 113: 2176-82.
- Kanth VV, Golla JP, Sastry BK *et al* (2011) Genetic interactions between MTHFR (C677T), methionine synthase (A2756G, C2758G) variants with vitamin B12 and folic acid determine susceptibility to premature coronary artery disease in Indian population. J Cardiovasc Dis Res 2: 156-163.
- Karnik P, Chen P, Paris M, Yeger H and Williams BRG. (1998) Loss of heterozygosity at chromosome 11p15 in Wilms tumors: identification of two independent regions. Oncogene 17:237-240.
- Kaste SC, Dome JS, Babyn PS, Graf NM, Grundy P, Godzinski J, Levitt GA and Jenkinson H. (2008) Wilms tumor: prognostic factors staging, therapy and late effects. Pediatric Radiol 38:2-17.
- Katherine K, Matthay, MD, Villablanca JD, Seeger RC *et al.* (1999) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. New England Journal of Medicine. v.341, p.1165-1173.
- Kawakami K, Omura K, Kanehira E *et al* (1999) Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. Anticancer Res. 19:3249-3254.
- Kebriaei P; Anastasi J; Larson RA (2003) Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. Best Practice & Research Clinical Haematology, v.15, n.4, p. 597-621.
- Kim S and Chung DH (2006) Pediatric Solid Malignancies: neuroblastoma and Wilms' tumor. Surg Clin North Am.86(2): p.469-87
- Kim YL (1999) Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms and implications. J Nutr Biochem. 10:66-88.
- Klamt B, Schulze M, Thate C, *et al.* (1998) Allele loss in Wilms tumors of chromosome arms 11q, 16q, and 22q correlate with clinicopathological parameters. Genes Chromosomes Cancer. 22:287-94.

- Kluijtmann LA, Van Der Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, Van Oost BA, Trijbels FJ and Rozen RI (1996) Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 58:35-41
- Klumb CE (2001) Biology and pathogenesis of B non-hodgkin lymphoma in childhood: a review. *Rev. Bras de Cancerologia*. 47(3): 291-301.
- Knudson Jr AG. (1978) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820–5.
- Knudson, A. G., Jr., and Strong, L. C. (1971) Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J. Natl. Cancer Inst.*, 48: 313–324.
- Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, Briner J and, Doeberitz MVK (1999) Mutational Activation of the b-Catenin Proto-Oncogene Is a Common Event in the Development of Wilms' Tumors. *Cancer Research* 59:3880–3882.
- Korones DN (2007) Treatment of newly diagnosed diffuse brain stem gliomas in children: In search of the holy grail. *Expert Rev Anticancer Ther* 7:663–674
- Koshinaga T, Ohashi K, Sugitou K, Ikeda T. (2013) Clinical features of solid malignant tumors in childhood. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2013 Jul;40(7):825-32.
- Krajinovic M, Costea I and Chiasson S (2002) Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukemia. *The Lancet* 339: 1033-34.
- Kumar R, Achari G, Banerjee D and Chhabra DK (2001) Uncommon presentation of medulloblastoma. *Child's nervous system: ChNS Official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 17(9):538-542.
- Laanpere M, Altmäe S, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Yngve A, Salumets A (2010) Folate mediated one-carbon metabolism and effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutr Rev* 68:99-113.
- Lamont JM, McManamy CS, Pearson AD, Clifford SC, Ellison DW (2004) Combined histopathological and molecular cytogenetic stratification of medulloblastoma patients. *Clin Cancer Res*.10(16): 5482–5493.
- Laverdiere C, Chiasson S, Costea I *et al* (2002) Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100: 3832–3834.
- Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LN, Seifried A. (2002) B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal risk (United States) *Cancer Causes Control*.13: 239-48.
- Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, *et al*. (1998) Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA*.95:3059-64.
- Lee Y, Miller HL, Jensen P, Hernan R, Connelly M, Wetmore C, Zindy F, Roussel MF, Curran T, Gilbertson RJ and Peter J. McKinnon (2003) A Molecular Fingerprint for Medulloblastoma1. *Cancer Research*. 63, 5428–5437.
- Leite EP, Muniz MTC, Azevedo ACAC, Souto FR, Maia ACL, Gondim CMF, Bandeira FMGC and Melo RAM (2007) Prognostic factors in children and adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant*. 7 (4):413-421.

- Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, et al. (1996) Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 5: 1867–1874.
- Levine AJ, Lee W, Figueiredo JC, Conti DV, Vandenberg DJ, Davis BD, Edlund CK, Henning SM, Heber D, Stern MC and Haile RW (2011) Variation in folate pathway genes and distal colorectal adenoma risk: a sigmoidoscopy-based case–control study. *Cancer Causes Control* 22:541–552.
- Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD (1996) Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Human Molecular Genetics*. 5: 1851-1858.
- Liehr T. (2009) Fluorescence in situ hybridization (FISH) – Application Guide. Springer Protocols.
- Lissowska J, Gaudet MM, Brinton LA, et al. (2007) Genetic polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and Breast cancer risk: a population-based case-control study and meta-analyses. *Int J Cancer*. 120: 2696-2703.
- Little PM et al. (2011) Analysis of retinoblastoma age incidence data using a fully stochastic cancer model. *International Journal Of Cancer*, England, p.631-640.
- Liu, Y. et al. (2005) *Japanese Journal of Clinical Oncology*. Radiation treatment for medulloblastoma: a review of 64 cases at a single institute. v. 35, n. 3, p. 111-115.
- Ljungman G, Jakobson A, Behrendtz M, Torben EK, et al. (2011). Incidence and survival analyses in children with solid tumours diagnosed in sweden between 1983 and 2007. *Acta Paediatrica*. 100 (5), 750–757.
- Lo KC, Ma C, Bundy BN, Pomeroy SL, Eberhart CG, Cowell JK. (2007) Gain of 1q is a potential univariate negative prognostic marker for survival in medulloblastoma. *Clin Cancer Res*. 13(23):7022–7028.
- Lopes AA, Oliveira AM and Prado CB (2002) Principais genes que participam da formação de tumores. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 2(2): 1-7.
- Lucock M, Daskalakis I, Briggs D, et al (2000) Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy: influence of 677C→T methylenetetrahydrofolate reductase and 2756A→G methionine synthase genotypes. *Mol Genet Metab* 70:27-40.
- Lukusa AK, Aloni MN, Kadima-Tshimanga B, Mvitu-Muaka et al. (2012) Retinoblastoma in the Democratic Republic of Congo: 20-Year Review from a Tertiary Hospital in Kinshasa. *Journal of Cancer Epidemiology*.1-5.
- Luo HR, Lu XM, Yao YG, Horie N, Takeishi K, Jorde LB, et al. (2002) Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in Chinese populations and evolution of the novel alleles. *Biochem Genet*. 40(1-2):41-51.
- Lupo PJ, Noursome D, Kamdar KY, Okcu MF and Scheurer ME (2012) A case-parent triad assessment of folate metabolic genes and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Causes Control*. 2012 November ; 23(11): 1797–1803.
- Ma XL, Gong LP, Zhou CJ, Zhang DW, Jin M, Wang HM (2012) N-myc gene copies in children with neuroblastoma and its clinical significance. *ZhongguoShiYanXueYeXueZaZhi*. 20(6):1447-51.
- Mairal A, Pinglier E, Gilbert E, Peter M, Validire P, Desjardins L, Doz F, Aurias A, Couturier J (2000) Detection of chromosome imbalances

- in retinoblastoma by parallel karyotype and CGH analyses. *Genes Chromosomes Cancer*. 28(4):370-9.
- Marsh S (2005) Thymidylate synthase pharmacogenetics. *Invest New Drugs*. 23:533-7.
- Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. (2000) Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Hum Mutat*. 16(6):528.
- Marsh S, Collie-Duguid ESR, Li T, Liu X, McLeod HL. (1999) Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics*.58:310-2.
- Martins BLJ, Corrêa CF e Peres MM (2011) Análise de fatores prognósticos relacionados à sobrevida de crianças portadoras de meduloblastoma. *Estação Científica (UNIFAP) Macapá*. 1(1): 01-08.
- Matakidou A, Galta R, Rudd MF , Webb EL, Bridle H, Eisen T, Houlston RS and the GELCAPS Consortium (2013) Prognostic significance of folate metabolism polymorphisms for lung cancer. *British Journal of Cancer* 97, 247 – 252
- Matherly LH (2004) Human reduced folate carrier gene and transcript variants: functional, physiologic, and pharmacologic consequences. *Current Pharmacogenetics*. 2:287–298.
- Matherly LH and Goldman ID (2003) Membrane transport of folates. *Vitamins & Hormones*. 66: 403-456.
- Matherly LH, Hou Z and Deng Y. (2007) Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Reviews* 26, 111-128.
- Matsuo K; Suzuki R; Hamajima N; Ogura M; *et al.* (2001). Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood*,97:3205-3209.
- Matthews RG, Sheppard C, Goulding C. (1998) Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur J Pediatr*.157(2):54-9.
- McCabe MG, Backlund LM, Leong HS, Ichimura K and Collins VP (2011) Chromosome 17 alterations identify goodrisk <and poor-risk tumors independently of clinical factors in medulloblastoma. *Neuro-Oncology* 13(4):376–383, 2011.
- McCabe MG, Ichimura K, Liu L, *et al.* (2006) High-resolution array-based comparative genomic hybridization of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*. 65(6):549–561.
- McLean TW and Buckley KS. (2010) Pediatric genitourinary tumors. *Curr Opin Oncol* 22: 268-273.
- Meel, R; Radhakrishnan, V; Bakhshi, S. (2012) Current therapy and recent advances in the management of retinoblastoma. *Indian Journal Of Medical And Paediatric Oncology* 80-88.
- Melo GJO (2004) A importância do ácido fólico para o desenvolvimento embrionário e seu papel protetor de ocorrência de gestações afetadas pelos defeitos do tubo neural fetal. *Saúde tecnologia e questão social*. 1(1): 1-20.
- Mendrzyk F, Korshunov A, Toedt G, *et al.* (2006) Isochromosome breakpoints on 17p in medulloblastoma are flanked by different classes of DNA sequence repeats. *Genes Chromosomes Cancer*. 45(4):401–410.

- Mertens F; Mandahl N; Mitelman F; Heim S. (1994) Cytogenetic analysis in the examination of solid tumors in children. *Pediatr Hematol Oncol.* 11(4):361-377.
- Mezzomo CSL, Garcias GL, Sclowitz ML, Sclowitz IT, Brum CB, Fontana T and Unfried RI. (2007) Prevention of neural tube defects: prevalence of folic acid supplementation during pregnancy and associated factors in Pelotas, Rio Grande do Sul State, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 23(11):2716-2726, nov, 2007
- Miller SA; Dykes DD; Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.
- Mohammed AM, *et al.* (2009) Constitutional retinoblastoma gene deletion in Egyptian patients. *World J Pediatr*, Cairo, p.222-225.
- Mokarram P, Naghibalhossaini F, Firoozi MS, *et al.* (2008) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype affects promoter methylation of tumor-specific genes in sporadic colorectal cancer through an interaction with folate/vitamin B12 status. *World J Gastroenterol*;14:3662–3671
- Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, Schweinitz DV, Simon T, Cohn SL and Pearson ADJ (2009) The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. *Journal of clinical oncology.* 27(2): 298-303.
- Morin I, Devlin AM, Leclerc D *et al* (2003) Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. *Mol Genet Metab* 79: 197–200.
- Mueller S, Chang S. (2009) Pediatric Brain Tumors: Current treatment strategies and future therapeutic approaches. *Neurotherapeutics.* 6:570-586.
- Mulhern RK, Horowitz ME, Kovnar EH, *et al* (1989) Neurodevelopmental status of infants and young children treated for brain tumors with preirradiation chemotherapy. *J Clin Oncol* 7:1660-1666.
- Narayanan S; Mcconnell J; Little J; Sharp L, *et al.* (2004) Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (Strand Breaks, Misincorporated Uracil, and DNA Methylation Status) in human lymphocytes in vivo. *Cancer epidemiol biomarkers prev.* 13(9):1436 - 1443.
- Nascimento CA, Monteiro EM, Vinhaes AB, Cavalcanti LL, Ramos MB (2009) O Câncer infantil (leucemia): Significação de algumas vivências maternas. *Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste.* 2(33).
- Nassiri M, Kooshyar MM, Roudbar Z, Mahdavi M, Doosti M (2013) Genes and SNPs Associated with Non-hereditary and Hereditary Colorectal Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol. 14.
- Neglia JP, Friedman DL, Yasui Y, Mertens AC, Hammond S, Stovall M, Donaldson SS, Meadows AT and Robison LL (2001) Second Malignant Neoplasms in Five-Year Survivors of Childhood Cancer: Childhood Cancer Survivor Study. *Journal of the National Cancer Institute.* 93(8):618-629.
- Neves, JALL (2006) Meduloblastomas: Uma experiência de dez anos no Hospital Infantil Joana Gusmão. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Curso de Medicina, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 33 f.

- Nickerson HJ, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Perez C, Atkinson JB, Selch M, Gerbing RB, Stram DO and John Lukens (2000) Favorable Biology and Outcome of Stage IV-S Neuroblastoma With Supportive Care or Minimal Therapy: A Children's Cancer Group Study. 18(3):477-486.
- Niclot S, Pruvot Q, Besson C *et al* (2006) Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas. Blood 108:278-85.
- Niedzielska E, Węclawek-Tompol J, Matkowska-Kocjan A, Chybicka A (2013) The Influence of Genetic RFC1, MS and MTRR Polymorphisms on the Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia Relapse in Children and the Adverse Effects of Methotrexate Adv Clin Exp Med 22(4): 579–584.
- Nordfors K *et al.* (2010) The tumour-associated carbonic anhydrases CA II, CA IX and CA XII in a group of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumours: an association of CA IX with poor prognosis. BioMed Central Cancer. 10:148.
- O'Leary VB, Pangilinan F, Cox C, Parle-McDermott A, Conley M, Molloy AM, Kirke PN, Mills JL, Brody LC, Scott JM (2006) Reduced folate carrier polymorphisms and neural tube defect risk. Molecular Genetics and Metabolism. 87:364-369.
- Odono Filho V, Maluf JR PT, Sanna MC and Eustáquio MS. (1983) Dois tumores sólidos frequentes na infância: Neuroblastoma e tumor de wilms - revisão e atualização. Pediat. 5:155-161.
- Oliveira KC, Bianco B, Verreschi ITN, Guedes AD, Galera BB, Galera MF, Barbosacp and Lipay MVN (2008) Prevalence of the Polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T Is Related to Chromosomal Aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome Patients. Arq Bras Endocrinol Metab 2008;52/8
- Olteanu H and Banerjee R (2001) Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. Journal of Biological Chemistry. 276:35558-35563.
- Ongaro A, De Mattei M, Porta MGD, Rigolin G, Ambrosio C, Raimondo FD, Pellati A, Masieri FF, Caruso A, Catozzi L and Donato Gemmati5 (2009) Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. haematologica 94(10).
- Othman IS (2012) Retinoblastoma major review with updates on Middle East management protocols. Saudi Journal of Ophthalmology. 26, 163–175.
- Packer RJ (1999) Brain tumors in children. Arch Neurol. 56:421- 425.
- Paderova J, Orlic-Milacic M, Yoshimoto M, Da Cunha GS, *et al.* (2007) Novel 6p rearrangements and recurrent translocation breakpoints in retinoblastoma cell lines identified by spectral karyotyping and mBAND analyses. Cancer Genet Cytogenet. 179(2):102-11.
- Pan, E. *et al.* (2005) Isochromosome 17q Is a Negative Prognostic Factor in Poor-Risk Childhood Medulloblastoma Patients. Clinical Cancer Research. 11: 4733.
- Park AK, Lee SJ, Phi JH, Wang KC, Kim DG, Cho BK, Haberler C, Fattet S, Dufour C, Puget S, Sainte-Rose C, Bourdeaut F, Grill J, Delattre O, Kim SK and Park WY (2012) Prognostic classification of pediatric medulloblastoma

- based on chromosome 17p loss, expression of MYCC and MYCN, and Wnt pathway activation. *Neuro-Oncology* 14(2):203–214.
- Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, et al. (2002) Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res* 62: 4519–4524.
- Pei L, Zhu H, Ren A *et al* (2005) Reduced folate carrier gene is a risk factor for neural tube defects in a Chinese population, *Birth Defects. Res A Clin Mol Teratol* 73: 430–433.
- Pereira AC; Schettert IT; Morandini-Filho AA; Guerra-Shinohara EM; Krieger JE (2004) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate deficient population. *Clin Chim Acta.* 340:99 - 105.
- Perlman EJ, Grundy PE, Anderson JR, Jennings LJ, Green DM, Dome JS, Shamberger RC, Ruteshouser EC and Huff V (2011) WT1 Mutation and 11P15 Loss of Heterozygosity Predict Relapse in Very Low-Risk Wilms Tumors Treated With Surgery Alone: A Children's Oncology Group Study. *Journal Of Clinical Oncology.* 29(6):698-703.
- Pfister S, Remke M, Benner A, *et al.* Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci. *J Clin Oncol.* 2009;27(10):1627–1636.
- Pietras W. (2012) Advances and changes in the treatment of children with nephroblastoma. *Adv Clin Exp Med.* 21(6):909-820.
- Pietrzik K, Bailey L and Shane B (2010) Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate. Comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 49(8):535-48.
- Pogorzala M, Styczynski J, Wysocki M (2014) Survival and Prognostic Factors in Children with Brain Tumors: Long-term Follow-up Single Center Study in Poland. *Anticancer Res.* 34(1):323-6.
- Potluri VR, Helson L, Ellsworth RM, Reid T, Gilbert F (1986) Chromosomal abnormalities in human retinoblastoma. A review. *Cancer.* 58(3):663-71.
- Prasad PD, Ramamoorthy S, Leibach FH and Ganapathy V (1995) Molecular cloning of the human placental folate transporter. *Bochem Biophys Res Commun* 206:681-687.
- Prasil P, Lamberge JM, Bond M, Berstein M, Pippi-Salle JL, Bernard C *et al.* (2000) Management Decisions in children With Nephroblastomatosis. *Med Ped Oncol*, 35: 429-432.
- Pritchard JK. (2002) Controversies and advances in the management of Wilm's tumor. *Arch Dis Child*, 87: 241-244.
- Qi X, Sun X, Xu J, Wang Z, Zhang J, Peng Z (2014) Associations between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and hepatocellular carcinoma risk in Chinese population. *Tumour Biol.* 2014 Jan 3. [Epub ahead of print].
- Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tying SK and Matalon RK (2001) Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas, a report of a novel *MTHFR* polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet* 107:162-168.
- Raffel, C. (2004) Medulloblastoma: molecular genetics and animal models. *Neoplasia.* n. 6, P. 310-322.

- Ramos FJC; Muniz MTC; Silva VC; Araujo M, et al. (2006) Association between the MTHFR A1298C polymorphism and increased risk of acute myeloid leukemia in Brazilian children. *Leukemia & Lymphoma* 00(0): 1 - 6.
- Reis AHO, Vargas FR and Lemos B. (2012) More epigenetic hits than meets the eye: microRNAs and genes associated with the tumorigenesis of retinoblastoma. *Genetics and epigenetics of retinoblastoma*. 3 | Article 284.
- Robien K, Ulrich CM. (2003) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol*. 157:571-82.
- Rodrigues KE and Camargo B (2003) Diagnóstico precoce do câncer infantil: Responsabilidade de todos. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 49 (1):29-34.
- Rodrigues KES. *et al.* (2004) Atraso no diagnóstico do retinoblastoma. *Jornal de Pediatria*, p.511-516.
- Rondinelli PIP, Martinez CAO, SanemaTsu JR, PI (2004) Meduloblastomas: experiência de dez anos do Departamento de Pediatria do Hospital do Câncer de São Paulo. *Prática Hospitalar*. (6)35.
- Rossi MR, Conroy J, McQuaid D, Nowak NJ, Rutka JT, Cowell JK. (2006) Array CGH analysis of pediatric medulloblastomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 45(3):290–303.
- Sadlish H, Willims FMR, Flintoff WF (2002) Cytoplasmic domains of the reduced folate carrier are essential for trafficking, but not function. *Biochem J*. 364: 777-786.
- Sandoval JFF and Santiago A (2000) M. H. Experiencia con radioterapia em el manejo de tumores del sistema nervioso central en niños. *Revista Del Instituto Nacional de Cancerología*. 46(2).
- Santa anna TKB, Neves IM, Trad CS, Zuppani AC and Rigueiro MP (2009) Meduloblastoma nodular – achados de imagem de uma rara variante: relato de caso. *Revista Imagem (Online)*. 31(1/2):29-32.
- Santos LMP and Pereira MZ (2007) The effect of folic acid fortification on the reduction of neural tube defects. *Cad. Saúde Pública*. 23(1):17.
- Sarkar C, Deb P and Sharma MC (2006) Medulloblastomas: New directions in risk stratification. *Neurology India*. 54(1).16-23.
- Schwab M, Shimada H and Joshi V (2000) Neuroblastic tumours of adrenal gland and sympathetic nervous system. In: Kleihues P, Cavenee WK, editors. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics: tumours of the nervous system*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; p.153.
- Schwab PM; Westermann F; Hero B; Berthold PF (2003) Review - Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The Lancet Oncology*. 4(8):472-480.
- Scott RH, Murray A, Baskcomb L, Turnbull C, *et al.* (2012). Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget* 3(3):327-35.
- Seabright MA (1971) Rapid technique for human chromosomes. *Lancet*, 2:971-972.
- Segers H, van den Heuvel-Eibrink MM, Williams RD, van Tinteren H, Vujanic G, Pieters R, Pritchard-Jones K, Bown N and Children's Cancer and Leukaemia Group and the UK Cancer Cytogenetics Group (2013) Gain of 1q is a marker of poor prognosis in Wilms' tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 52(11):1065-74.

- Sethi S, Pushker N, Kashyap S, Sharma S, Mehta M, Bakhshi S, Khurana S and Ghose S (2013) Extraocular retinoblastoma in Indian children: clinical, imaging and histopathological features. *Int. J Ophthalmol* 6(4):481-486.
- Sharp L and Little J (2004) Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 159:423–443
- Sharp L and Little J. (2004) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 159:423–443.
- Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H *et al* (2002) Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. *Am J Med Genet* 108: 1–6.
- Sheng WW, Soukup S, Bove K, Gotwals B, Lampkin B. (1990) Chromosome analysis of 31 Wilms' tumors. *Cancer Res.* 50:2786-93.
- Shimada H, Chatten J, Newton W JR, *et al.* (1984) Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute*; 73:405–16.
- Sierra EE, Goldman ID (1999) Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates. *Seminars in Oncology.* 26: 11-23.
- Simonato, LE *et al.* (2007) Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. *J Bras Patol Med Lab*, 43(2):121-127.
- Sirachainan N, Wongruangsri S, Kajanachumpol S (2008) Folate pathway genetic polymorphisms and susceptibility of central nervous system tumors in Thai children. *Cancer Detect Prev* 32: 72-78.
- Sirotnak FM and Tolner B (1999) Carrier mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annual Review of Nutrition.* 19, 91-122.
- Sisley K, Nichols C, Parsons MA, Farr R, Crees R and Rennie IG (1998) Clinical applications of chromosome analysis, from fine needle aspiration biopsies, of posterior uveal melanomas. *Eye.* 12, 203-207.
- Skibola CF, Forrest MS, Coppede F *et al* (2004) Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 104: 2155–2162
- Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Robert AC, Law GR, *et al.* (2002) Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood.* 99(10):3786-91.
- Spitz R; Hero B; Ernestus K; Berthold F. (2003) Gain of Distal Chromosome Arm 17q Is Not Associated with Poor Prognosis in Neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 9(13):4835 - 480.
- Spreafico F and Bellani FF. (2006) Wilms' tumor: past, present and (possibly) future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 6(2):249-58.
- Spreafico F and Bellani FF. Wilms' tumor: past, present and (possibly) future. *Expert Rev Anticancer Ther.* Feb;6(2):249-58 (2006).
- Squire J, Phillips RA, Boyce S, Godbout R, Rogers B, Gallie BL (1984) Isochromosome 6p, a unique chromosomal abnormality in retinoblastoma: verification by standard staining techniques, new densitometric methods, and somatic cell hybridization. *Hum Genet.* 1984;66(1):46-53.

- Sridhar S, Al-Moallem B, Kamal H, Terrile M, Stallings RL. (2013) New Insights into the Genetics of Neuroblastoma: Implications for Diagnosis and Therapy. *Mol Diagn Ther*.
- Stigliani S, Coco S, Moretti S, Oberthuer A, *et al*. (2012). High Genomic Instability Predicts Survival in Metastatic High-Risk Neuroblastoma. *Neoplasia*. 14(9): 823–832.
- Stock C, Ambros IM, Lion T, *et al*. (2002) Genetic changes of two Wilms tumors with anaplasia and a review of the literature suggesting a marker profile for therapy resistance. *Cancer Genet Cytogenet*. 135:128-38.
- Strong LC. (2003) The two-hit model for Wilms' tumor: where are we 30 years later? *Genes Chromosomes Cancer*. 38:294-9.
- Sugayama SMM, Síndrome de Pallister-Killian ou tetrassomia do braço curto do cromossomo 12 em mosaico: relato de dois casos diagnosticados pela hibridização in situ por fluorescência, *Casuísticacase reports*, São Paulo, 2000.
- Sümer-Turanligil NC, Cetin EO, Uyanikgil Y. (2013) A contemporary review of molecular candidates for the development and treatment of childhood medulloblastoma. *Childs Nerv Syst*.29(3):381-8.
- Sung KW, Yoo KH, Koo HH, Kim JY, Cho EJ, Seo YL, Kim J and Lee SK (2009) Neuroblastoma Originating from Extra-abdominal Sites: Association with Favorable Clinical and Biological Features. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 461-7
- Swartz MD, Peterson CB, Lupo PJ, Wu X, Forman MR, Spitz MR, Hernandez LM, Vannucci M and Shete S (2013) Investigating Multiple Candidate Genes and Nutrients in the Folate Metabolism Pathway to Detect Genetic and Nutritional Risk Factors for Lung Cancer. *Plos One*. 8(1)1-9.
- Tan SS and Mteta KA (2011) Late presentation of Wilms' tumour to a tertiary hospital. *African Journal of Paediatric Surgery*. 8 (2): 263-4
- Teixeira RAP, Bruniera P, Sredni ST and Próspero JD (2001) Wilms' tumor: clinical, histological and immunohistochemical (p53) evaluation and prognosis Tumor de Wilms: evaluación clínica, histológica, inmunohistoquímica (p53) y pronóstico. *Pediatría* 23(2):137-45.
- Torres J, Regan PL, Edo R, Leonhardt P, Jeng EI, Rappaport EF, Ikegaki N, Tang XX (2010) Biological effects of induced MYCN hyper-expression in MYCN-amplified neuroblastomas. *Int J Oncol*. 37(4):983-91.
- Torres VLL e ERWENNE, CM. (2012) Retinoblastoma: diagnóstico e estadiamento clínico da doença na última década. *Lilacs*.
- Tournade MF, Com-Nougué C, Kraker J, Ludwig R, Rey A, Burgers JMB, Sandstedt B, Godzinski J, Carli M, Potter R and Zucker JM (2001) Optimal Duration of Preoperative Therapy in Unilateral and Nonmetastatic Wilms' Tumor in Children Older Than 6 Months: Results of the Ninth International Society of Pediatric Oncology Wilms' Tumor Trial and Study. *Journal of Clinical Oncology*. 19(2):488-500.
- Trinh BN, Ong CN, Coetzee GA, Yu MC, Laird PW (2002) Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels. *Hum Genet*.111(3):299-302.
- Ulrich C, Bigler J, Bostick R, Fosdick L, Potter JD (2002) Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res*. 62:3361-4.

- Ulrich C; Bigler J; Velicer C; Greene E; Farin F; Potter J. (2000) Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9:1381 -1385.
- Ulrich CM; Curtin K; Potter JD; Bigler J; *et al.* (2005). Polymorphisms in the Reduced Folate Carrier, Thymidylate Synthase, or Methionine Synthase and Risk of Colon Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(11): 2509-2516.
- Ulvik A, Vollset SE, Hansen S, *et al.* (2004) Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C!T and methionine synthase 2756A!G polymorphisms: A study of 2,168 case-control pairs from the JANUS cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13:2175-2180.
- Usmani BA (1993) Genomic instability and metastatic progression. *Pathobiol* 61: 109-116.
- Valera ET, Brassesco MS, Scrideli CA and TONE, LG. (2010) Tetraploidization in Wilms tumor in an infant. *Genet. Mol. Res.* 9 (3): 1577-1581.
- Van Der Put NM, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RPM, Trijbels FMJ, Eskes TKAB, Mariman ECM, den Heyer M and Bloon HS (1996) Decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity due to the 667 C→T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol. MED* 74:691-694.
- Varanasi R, Bardeesy N, Ghahremani M, Petruzzi MJ, Nowak N, Adam MA, Grundy P, Shows TB, and Pelletier J. Fine structure analysis of the WT1 gene in sporadic Wilms tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3554-3558 (1994).
- Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Castilla EE and Orioli IM (2008) Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only Brazilian *Journal of Medical and Biological Research* (2008) 41: 689-693.
- Vujani GM and Sandstedt B (2010) The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology approach. *J Clin Pathol* 2010 63: 102-109.
- Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, Kelsey A, Leuschner I, Kraker J, *et al.* Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) Working Classification of Renal Tumors of Childhood. *Med Pediatr Oncol*. 38-79-82 (2002).
- Wang L, Chen W, Wang J *et al* (2006) Reduced folate carrier gene G80A polymorphism is associated with an increased risk of gastroesophageal cancers in chinese population. *Eur J Cancer* 42:3206-3211.
- Wang Y, Guo W, He Y, Chen Z, Wen D, Zhang X *et al.* (2007) Association of MTHFR C677T and SHMT1 C1420T with susceptibility to ESCC and GCA in a high incident region of Northern China. *Cancer causes control* 18:143-52.
- Watkins D, RU M and Hwang HY *et al* (2002) Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency cblG: structure of the MTR gene, genotype diversity and recognition of a common mutation P1173L. *Am J Hum Genet* 71:143-153.
- Weinstein J, Katzenstein H and Cohn SL (2003) Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *The Oncologist*. 8:278-292.
- Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rozen R (2001) The 1298AC polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 156: 409-415.

- Whetstine JR, Flatley RM, Matherly LH (2002) The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochemical Journal*. 367 (3):629-640.
- Whetstine JR, Gifford AJ, Witt T *et al* (2001) Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier: characterization of a high-frequency G/A variant at position 80 and transport properties of the His[27] and Arg[27] carriers. *Clin Cancer Res* 7: 3416-3422.
- Wiener JS, Coppes MJ, Ritchey ML. Current concepts in the biology and management of Wilms tumor. *J Urol* 1998; 159:1316-25.
- Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z *et al.* (2003) Geographical and ethnic variation of the 677C-T allele of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 40: 619-625.
- Williams RD, Hing SN, Greer BT, Whiteford CC, Wei JS, Natrajan R, Kelsey A, Rogers S, Campbell C, Pritchard-Jones K and Khan J. (2004) Prognostic Classification of Relapsing Favorable Histology Wilms Tumor Using cDNA Microarray Expression Profiling and Support Vector Machines. *Genes, Chromosomes & Cancer* 41:65–79.
- Wisoff JH, Boyett JM, Berger MS, Brant C, Li H, Yates AL, McGuire-Cullen P, Turski PA, Sutton LN, Allen JC, Packer RJ and Finlay JL (1998) Current neurosurgical management and the impact of the extent of resection in the treatment of malignant gliomas of childhood: a report of the Children's Cancer Group Trial no CGC-945. *Journal of Neurosurgery*. 89: 52-59
- Woeller CF; Anderson DD; Szebenyi DM; Stover PJ. (2007) Evidence for small ubiquitin-like modifier-dependent nuclear import of the thymidylate biosynthesis pathway. *J Biol Chem*. 282:17623 - 17631.
- Yachnis AT. (1997) Neuropathology of pediatric brain tumors. *Seminars in Pediatric Neurology*. 4,282-291.
- Yang IH, Kuo HK, Chen YJ, Lee JJ and Lin SA (2008) Review of 20 years' clinical experience with retinoblastomas in southern Taiwan. 31 (5):484-491
- Yong MH, Hwang WS, Knight LA, Fung W, *et al.* (2009) Comparing histopathological classification with MYCN, 1p36 and 17q status detected by fluorescence in situ hybridisation from 14 untreated primary neuroblastomas in Singapore. *Singapore Med J*. 50(11):1090.
- Yuan E, Li CM, Yamashiro DJ, *et al.* (2005) Genomic profiling maps loss of heterozygosity and defines the timing and stage dependence of epigenetic and genetic events in Wilms' tumors. *Mol Cancer Res*. 3:493-502.
- Yuan JM, Lu SC, Van Den Berg D, *et al.* (2007) Genetic polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes and risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 46:749-758.
- Yun, J *et al.* (2011) Epidemiology and Rb1 gene of retinoblastoma. *International Journal Of Ophthalmology*, 103-109.
- Zanrosso CW; Hatagima A; Emerenciano M; Ramos F; *et al.* (2005) The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. *Leu Research*.
- Zeltzer PM, Boyett JM, Finlay JL, Albright AL, Rorke LB, Milstein JM, Allen JC, Stevens KR, Stanley P, Li H, Wisoff JH, Geyer JR, McGuire-Cullen P, Stehbens JA, Shurin SB and Roger J. Packer (1999) Metastasis Stage,

- Adjuvant Treatment, and Residual Tumor Are Prognostic Factors for Medulloblastoma in Children: Conclusions From the Children's Cancer Group 921 Randomized Phase III Study. *Journal of Clinical Oncology*, 17(3):832-845.
- Zhang G and Dai C. (2001) Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases. *Thromb Res*.104:187-95.
- Zhang L, Taub JW, Williamson M, Wong SC, Hukku B, Pullen J, Ravindranath Y, Matherly LH (1998) Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy. *Clin Cancer Res*. 4(9), 2169–2177.
- Zhao R, Matherly LH and Goldman ID (2009) Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissue. *Expert Rev Mol Med*. 11(4).
- Zhao Y, Chen Z, Ma Y, Xia Q, Zhang F, Fu D and Wang XF (2013) Lack of Association between Methionine Synthase A2756G Polymorphism and Digestive System Cancer Risk: Evidence from 39327 Subjects. *Plos One*. 8(4): 1-7.
- Zhu N, Gong Y, He J, Xia J and Chen X (2013) Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism on the Risk of Lung Cancer and the Clinical Response to Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: An Updated Meta-Analysis. *Yonsei Med J* 54(6):1384-1393
- Zhuang W; Wu XT; Zhou Y; Liu GJ; *et al.* (2009). Polymorphisms of Thymidylate Synthase in the 5'- and 3'-Untranslated Regions and Gastric Cancer. *Dig Dis Sci*, 54:1379–1385.
- Zielinski B, Gratias S, Toedt G, Mendrzyk F, Stange DE, Radlwimmer B, Lohmann DR, Lichter P (2005) Detection of chromosomal imbalances in retinoblastoma by matrix-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 43(3):294-301.
- Zingg JM; Jones PA (1997) Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*,18: 869-82.

ANEXO 1

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
COMPLEXO HOSPITALAR HUOC/PROCAPE**

Reunião: 25/05/2010

Protocolo CEP – HUOC/PROCAPE:nº 65/2010
CAAE: 0059.0.106.000-10

Projeto: Estudo citogenético e molecular na etiopatogênese de tumores embrionários (neuroblastoma, tumor de Wilms, retinoblastoma e meduloblastoma)

Pesquisador Principal: Maria Tereza Cartaxo Muniz

Resultado:

- Resultado do Projeto – **APROVADO**



Magaly Bushatsky
Vice-coordenadora
CEP-HUOC/PROCAPE

Pavilhão Ovídio Montenegro – 1º andar
Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE.
Fone: (81) 3184.1460 – Fone/Fax: (81) 3184.1271 - E-mail: cep_huoc.procape@yahoo.com.br

ANEXO 2

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE
PORTADOR DE TUMOR EMBRIONÁRIO OU PARA O RESPONSÁVEL**

ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA

Venho por meio desta, convidá-lo a participar do projeto de pesquisa “ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR NA ETIOPATOGENESE DE TUMORES EMBRIONÁRIOS (NEUROBLASTOMA, TUMOR DE WILMS, RETINOBLASTOMA, MEDULOBLASTOMA)”.

Este estudo tem como objetivo investigar a contribuição de genes que fazem parte do ciclo do metabolismo de folatos (*MTHFR*, *MS*, *TS*, e *RFC*) em crianças portadoras de tumores embrionários (tumor de Wilms, neuroblastoma, retinoblastoma e meduloblastoma), bem como caracterizar citogeneticamente esses tumores.

Os resultados deste estudo serão de grande valia, pois permite a caracterização citogenética e molecular dos tumores estudados no CEONHPE/HUOC. A caracterização dos tumores embrionários é importante para o melhor entendimento da doença e determinação do prognóstico e diagnóstico, além de permitir a estratificação dos pacientes em grupos de risco, possibilitando direcionar o tratamento e torná-lo mais eficaz, o que proporciona melhorias na qualidade de vida de crianças com essa malignidade.

Para realização deste projeto serão usadas amostras de sangue periférico ou amostras de tumor obtidas por punção venosa e ressecção cirúrgica, respectivamente.

A assinatura deste termo de consentimento autoriza a participação do seu filho(a) nesta pesquisa, assim como a utilização de:

- 1) Os dados clínicos registrados no prontuário médico;
- 2) Amostra de sangue periférico ou amostras de tumor colhidas durante procedimento rotineiro de diagnóstico.

Para que o Sr(a) possa autorizar a participação do seu filho(a) neste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

Obtenção de amostras de sangue periférico ou amostras de tumor:

O estudo será feito com o mesmo material (sangue periférico ou amostras de tumor) obtido para o diagnóstico de rotina do paciente com tumor embrionário (retinoblastoma, tumor de Wilms, meduloblastoma e neuroblastoma). Este procedimento não comprometerá o diagnóstico.

As amostras que sobraem dos testes ficarão estocadas nos Laboratórios de Citogenética e Biologia Molecular do CEONHPE, para estudos complementares dessa pesquisa, caso seja necessário.

Riscos:

Na há risco para o paciente, pois não será realizado nenhum procedimento além daquele usado na rotina para o estabelecimento do diagnóstico. A obtenção da amostra é realizada como procedimento de rotina independente da realização do estudo.

A Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Oswaldo Cruz aprovou este estudo, considerando-o ético e seguro, seguindo as exigências da Legislação Brasileira.

Benefícios:

O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com base nos resultados deste estudo, outras pessoas portadoras de tumores embrionários (retinoblastoma, tumor de Wilms, meduloblastoma e neuroblastoma) possam ser tratadas de forma mais particularizada e ter maior chance de cura.

Caráter confidencial dos registros:

Além da equipe de saúde que cuidará do seu filho, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Oswaldo Cruz - HUOC e a equipe de pesquisadores envolvidos. Sua identidade não será revelada ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação. Todas as informações desse estudo serão confidenciais e o Sr. (a) ou seu filho(a) não será identificado em nenhuma publicação.

Custos:

A participação no estudo é voluntária e não haverá nenhuma forma de pagamento, caso conceda sua autorização. O Sr. (a) ou seu filho(a) não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize a participação. Todos os cuidados assim como os tratamentos ministrados a seu filho(a) serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no estudo.

Não existirão custos para a realização da pesquisa.

Bases da participação:

É importante que o Sr.(a) saiba que a participação neste estudo é completamente voluntária e que pode recusar-se a participar ou interromper participação do seu filho(a) a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais ele(a) tem direito. Em caso de decidir interromper a participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

Garantia de esclarecimentos:

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida com os responsáveis pelo estudo: Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz (81-99056802) e Jemima Eline Xavier da Silva Barros (81-91521244) – Laboratório de Biologia Molecular/CEONHPE; Hospital Universitário Oswaldo Cruz (21011536) e Comitê de Ética (31841460). Se o Sr(a) tiver perguntas com relação aos direitos do seu filho(a) como participante desta pesquisa, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, o coordenador do Comitê de Ética do Hospital Universitário Oswaldo Cruz Dr. Wilson Oliveira- Av. Arnóbio Marques s/n.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para a participação do meu filho(a) no projeto: **“ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR NA ETIOPATOGENESE DE TUMORES EMBRIONÁRIOS (NEUROBLASTOMA, TUMOR DE WILMS, RETINOBLASTOMA, MEDULOBLASTOMA)”**

Entendo que os dados clínicos e material biológico poderão ser utilizados para a realização do referido projeto, e que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____/_____/_____
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

_____/_____/_____
(Assinatura do responsável pelo Paciente) dia mês ano

(Nome do responsável pelo Paciente – letra de forma)

_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____/_____/_____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

ANEXO 3

CLINICAL AND MOLECULAR PROGNOSTIC FACTORS AND SURVIVAL OF INFANTS WITH EMBRYONIC TUMOURS

Jemima E. X. S. Barros^{1,4}, Vera L. L. Moraes¹, Elker L. S. Lima^{1,2}, Maria
Madalena S. Vieira^{1,2}, Dyego de O. Miranda^{1,3}, , Neide Santos⁴, Maria T. C.
Muniz^{1,2,3}

1. Centro de Oncohematologia Pediátrica (CEONHPE), Hospital Universitário Oswaldo Cruz – HUOC/PE.
2. Universidade de Pernambuco – UPE, Faculdade de Ciências Médicas – FCM.
3. Universidade de Pernambuco – UPE, Instituto de Ciências Biológicas – ICB.
4. Genetic Department – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

***Corresponding author:**

Jemima Eline Xavier da Silva Barros

Centro de Oncohematologia Pediátrica,

Hospital Universitário Oswaldo Cruz

Rua: Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, 50050-210, Recife, PE, Brasil

Tel: 5581- 31841207

Fax: 5581- 31816366

Email: jemimaeline@gmail.com

ABSTRACT

The embryonic tumours constitute important cause of death in children, but little is known about the risk factors involved in the genesis of these tumors. To contribute to identification of susceptibility and prognosis factors, this study evaluates clinical and molecular parameters in children with neuroblastoma (NB), retinoblastoma (RB), Wilm's tumor (WT) and medulloblastoma (MB), accompanied in Oncohematology Pediatric service of the University Hospital Oswaldo Cruz – CEONHPE/HUOC. Clinical data of 51 patients with NB, 141 with RB, 97 with TW and 51 with MB were analyzed for gender, age, main complaints, tumor location, staging, spread of disease, levels of DHL and n-myc. Patients diagnosed with NB, RB, TW and MB were studied for polymorphisms *MTHFR C677T and A1298C*, *MTR A2756G*, *TYMS 2R/3R* and *SCL19A1 G80A*. Clinical and molecular data were analyzed on the survival. Only female sex, staging and DHL levels influence of statistically significant manner to lower survival rate of patients with NB. The spread of the disease and the staging contributes significantly to lower survival and worse prognosis of RB. The parameters studied seem not to influence the survival of patients with TW. Although the female sex showed a survival considerably less, only the spread of the disease and recidivate showed statistical significance regarding the survival of patients with MB. Only the MTR 2756AA genotypes may have influence in better survival in patients with RB. Other markers not exerted significant provide significant predictive information on the prognosis of tumors NB, RB, WT and MB. But new studies are needed to verify the impact of these variables in the treatment of children with cancer.

Key words: Embryonic tumors; survival; prognosis factors

1. INTRODUCTION

Solid tumors represent 40% of the malignancies of childhood, constituting a global health problem (Ljungman et al., 2011). Cancer is a significant cause of death among children, in the 1-14 year age group it comes second only to accidents as a cause of death (Harmon et al., 2011).

There were many changes in the management of pediatric malignant solid tumors in the past years. The survival of childhood cancer patients has been improving steadily over the past decades in developed countries (Brenner et al., 2007). However, large differences in the prognosis persist between the countries. The cure in developing countries is less than in developed countries, mainly because of advanced disease at diagnosis (Lukusa et al., 2012). Additionally, socio-economic factors and ongoing advances in therapies may have been responsible for at least part of the geographical differences observed (Steliarova-Foucher et al., 2006).

Previous studies had reported epidemiological and clinical characteristics of the solid tumors (Brenner et al., 2007; Lukusa et al., 2012; Steliarova-foucher et al., 2006; Katherine et al., 1999; Gilbertson, 2004; Korones, 2007; Donaldson et al., 1997; David et al., 2005; Uba et al., 2007). Recently, it was investigated the role of genotype influencing disease manifestations. Thus, increasing interests have emerged on the association of the genotype with the risk of developing diseases such as determinant of your presentation and evolution, as well as the influence of genotype as determinant of individual responses to treatment (Biolo et al., 2004).

Given the importance of folic acid on the risk of cancer (Sharp *et al.*, 2004), recent studies have suggested that the toxicity of drugs antifolates can be affected

by inherited polymorphisms single nucleotide (Snp) in the genes of metabolizing of folate (D'angelo et al., 2013). Thus, polymorphisms of genes for enzymes and proteins involved in the metabolism this nutrient, MTHFR C677T and A1298C, nutrient, MTR A2756G, 2R3R and G80A RFC TYMS, can be considered potent prognostic factors, influencing the evolution of the disease, the efficacy and the toxic effects of treatment (Ongaro 2009; Eissa et al., 2013).

The drugs are transported through the cell membrane by *RFC1*. Changes in transport properties of this carrier were associated with the *SLC19A1 G80A* polymorphism and have been recognized as a mechanism of drug resistance antifolato (Laverdiere 2002). The enzyme TYMS competes by substrate with MTHFR to convert dUMP to dTMP intracellular, a limiting step in the synthesis of DNA, it is therefore an important target for chemotherapy drugs in treating solid tumors (Chen et al., 2003). The MTHFR is a key enzyme in metabolism of folate and MTHFR polymorphisms have been associated with treatment outcome in patients with cancer. A2756G MTR variants affect DNA methylation, potential impact on the behavior of tumor (Matakidou et al., 2007). However, the observations that polymorphisms of this pathway may affect the efficacy of cytotoxic drugs provide a strong rationale for evaluating such variants as prognostic factors. But only few studies demonstrated the influence of prognostic factors in the survival of patients with solid tumors were performed in Brazil until that date.

The aim of this study was to determine clinical and molecular factors that interfered in the survival of children with neuroblastoma, retinoblastoma, Wilms` tumor and medulloblastoma. This information is important in the identification of local features of presentation of these pathologies. The study also may assist in

determining the diagnosis and prognosis of solid tumors of childhood, as well as influence in the choice of therapy and evaluation of the results of treatment in a public institution, contributing to the knowledge of assistance to children with cancer in Brazil.

2. PATIENTS AND METHODS

2.1 Patients and Samples

This is a retrospective study of type series of cases composed of a total of 340 patients for clinical analyzes and 182 for molecular study, with solid tumors of age under 19 years, admitted for treatment in the Oncohematology Pediatric service of the University Hospital Oswaldo Cruz – CEONHPE/HUOC, Recife, Brazil, from 1986 to 2013.

CEONHPE/HUOC is one of the largest Pediatric Oncology public centers of the north-northeast with 200 new cases per year. Is a national reference in the treatment of Nervous System tumors. Considering the existence of other centers for treatment of childhood cancer, the results of the present study represent the analysis of some cases of embryonic tumors seen in this region.

We analyzed 51 children (0-14 years old) with neuroblastoma, 141 children (0-19 years old) with retinoblastoma, 97 children (0-19 years old) with Wilms` tumor and 51 children (0-19 years old) with medulloblastoma, with histopathological diagnosis confirmed. The cases were identified through a search of medical records and confirmation of the clinical diagnosis with the physician responsible for monitoring of the patient in the CEONHPE/HUOC. Research of medical records was held for verification of clinical and epidemiological data of selected patients.

We also studied patients diagnosed with NB, RB, TW and MB analyzed for polymorphisms *MTHFR C677T and A1298C*, *MTR A2756G*, *TYMS 2R/3R and SCL19A1 G80A*.

This work has been submitted and approved by the Ethics Committee of the HUOC (CEP – HUOC/PROCAPE: nº 65/2010 CAAE: 0059.0.106.000-10).

2.2 Analyzed variables

The main analyzed variables were: sex, age, origin, major signs and symptoms, the primary site of tumor, metastasis, staging, treatment, laboratory parameters, current state, and polymorphisms in the genes of metabolizing of folate, as the table below (Table 1).

Table 1: Variables analyzed in this work to their tumors studied.

Solid tumor	Clinical Variables	Molecular Variables
Neuroblastoma	sex, the age at diagnosis, principal symptoms and signs, staging, the presence of metastasis, N-myc oncogene amplification, the dosage of lacteal dehydrogenase (DHL)	<i>MTHFR C677T</i> <i>MTHFR A1298C,</i>
Retinoblastoma	sex, the age at diagnosis, staging, laterality and tumor location	<i>MTR A2756G,</i> <i>TYMS 2R/3R</i>
Wilms` Tumor	sex and staging	<i>SCL19A1 G80A</i>
Medulloblastoma	the age at diagnosis, sex, staging, rates of relapse, and spread of the disease.	

2.3 Biological Samples

Peripheral blood samples were collected in tubes containing EDTA (BDVacutainer, Preanalytical Solutions, Franklin Lakes, NJ) and were immediately transported to the laboratory on ice. Tumors were obtained by surgical resection and transported in RPMI medium. Tumor samples embedded in paraffin blocks were used for dead patients.

2.4 DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by phenolchloroform method for molecular analysis adapted from Sambrook and Russell (2001). The DNA extraction from tumor samples in paraffin blocks was realized according to Nascimento *et al.* (2003).

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Investigation of polymorphisms *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G and *SLC19A1* A80G was performed using PCR-RFLP, the *TYMS* 2R/3R using PCR and *MTHFR* A1298C using AS-PCR. PCR conditions for the genotype analysis are shown in Table 1. The amplified alleles for all polymorphisms were visualized on agarose gel 3% after enzymatic digestion.

2.6 Statistical Analysis of the survival

Descriptive measures were used for statistical analysis. Survival rates of the patients were estimated using the Kaplan-Meier method, and survival curves were compared using the Log-Rank test. The overall survival analysis was performed using the patient's follow-up data, according to the statistical models in conjunction with the Kaplan-Meier and Log Rank (Mantel Cox), to assess the death risk in 252 months for patients with neuroblastoma, death risk in 329 months for patients with retinoblastoma, death risk in 349 months for patients with Wilms tumor and death risk in 266 months for patients with medulloblastoma. The survival time was calculated as the time from diagnosis to date of last follow up for patients who were still alive. The effect of risk factors in the survival time was evaluated through the Log Rank Cox regression model. All results with $p < 0.05$ were indicative of statistical significance. For the analysis, *GraphPad Prism 5.0* statistical programs were used.

3. RESULTS

3.1 Clinical results and survival analyzes

3.1.1 Neuroblastoma

We analyzed 51 patients for the clinical data obtaining and survival study (Table 2). 49,02% were male and 50,98% were female among patients with neuroblastoma. Survival analysis in relation to gender and the development of the

disease showed that the male gender presented a survival rate of 49,23% (252 months), while females possessed 33,49% (194 months) survival rate, being significantly smaller than the opposite sex ($p=0,0256$) (Fig. 1).

The average age among them was of 48,55 months (4 years), the youngest patient was a month and the oldest 202 months at diagnosis. The median age of patients was 37 months. Seven patients (13,73%) showed age less than one year and only 3,92% were the death. Patients aged less than one year showed larger survival (62,50%, 234 months) when compared with those patients who were ages older than a year (32,82%, 252 months), however there was no statistical relevance ($p=0,2450$) (Fig.1).

Visible tumors was present among the complaints of 33,33% patients, abdominal pain was observed in 31,37% of the patients, fever was present in 27,45% of the patients, 21,57% reported abdominal growth, 19,61% presented weight loss and 7,8% patients showed changes in intestinal pace, among other presentations.

Abdominal location of the primary tumor was seen at 66,67% of the cases studied and extra-abdominal location was observed in 33,33% of the patients. Patients with primary tumor located in the abdominal area showed a discreetly lower survival rate (43,75%, 252 months) compared to patients with extra-abdominal disease (57,14%, 194 months), however there was no statistical relevance ($p=0,9776$) (Fig.1).

The stage IV was identified in 60,78% patients, the stage IVS was present in 7,84% patients, 19,61% report stage III, the stage II was observed in 1,96% and 3,92% of the patient report stage I, 5,88% not stage reported. There was a survival of 18,71% (119 months) in stage IV; 77,77% (252 months) at the stadium

III; and 100% in stages I (109 months), II (7 months) and IVS (70 months), $p=0,0350$ (Fig.1).

DHL values were informed in 40 patients and levels of DHL were high (reference value: < 400 U) in 29 cases (56,86%). Patients with DHL >400 UI level had significantly lower survival (43,19%, 232 months) compared to patients with DHL <400 UI level (100%, 252 months), $p=0,173$ (Fig.1). Another laboratory parameter evaluated was the *n-myc* gene amplification, reported in 18 medical records. 83,33% was negative cases for gene amplification and 16,67% showed positive result. There are no relevant differences between the survival rate of patients with *n-myc* positive and *n-myc* negative ($p=0,8312$) (Fig.1).

The treatment was based on sessions of chemotherapy, radiotherapy and surgery. The global average survival of patients was 41,90%, 252 months.

3.1.2 Retinoblastoma

141 patients were analyzed from the medical records (Table 3). 51,06% were male and 48,94% were female. Survival analysis in relation to gender revealed 60,89% (301 months) survival rate for males and 42,95% (329 months) for females ($p=0,3621$) (Fig. 2). Patients with retinoblastoma were diagnosed between one month and nine years old, with mean age 29,26 months (2,5 years), ranging from one month to 155 months, and median of 24 months.

The main clinical signs and symptoms observed was decreased vision, leukocoria, weight loss, fever, pain, increased eyeball and proptosis. The disease was manifested of unilateral form in 60,99% patients and bilateral form was observed in 35,46%. 59,57% of the patients showed the intraocular disease and 34,04% of

the patients showed extraocular disease. The location was not reported in other patients. Optic nerve disease infiltration was observed in 29,79% patients, central nervous system metastases were present in 4,96% patients and infiltrations in the bone marrow were detected in 1,42% patients studied. Patients with unilateral (66%, 301 months) and intraocular (77,85%, 329 months) disease showed better survival when compared to patients with bilateral form (25,23%, 329 months) and extraocular disease (42,72%, 225 months) (Fig. 2).

The stage II was the most observed among patients with retinoblastoma (36,17%), followed by the stadium I (31,21%) and stadium III (24,82%). The estadio IV was seen in only 2,13% of the cases studied and 5.67% of the total cases have not had your staging reported. The best survival was observed in patients with stage I (94,12%, 329 months), followed by those patients in stage II (58,36%, 183 months) in stage III (42,91%, 225 months) and in stage IV (33,33%, 146 months) ($p<0,001$) (Fig. 2).

Retinoblastoma patients have been treated with chemotherapy and surgery. 84,39% patients was enucleated, 68,09% are alive without the disease, 0,71% patients are living with the disease and 24,11% patients were died. The average overall survival among patients with this malignancy was 55,17% for a total of 329 months.

3.1.3 Tumor de Wilms

Clinical data of 97 patients with Wilms`tumor were obtained from medical records (Table 4). Patients with Wilms`tumor were represented by 46 (47,42%) male

children and 51 (52,58%) female children. Survival analysis in relation to the genus has shown that the female (81,25%, 349 months) presents a survival quietly increased in relation to the survival of male children (79,27%, 252 months), which does not represent statistical relevance ($p=0,9188$) (Fig. 3). The average age among them was 61,04 months (5,1 years), the median age of patients was 48,5 months, being the youngest diagnosed patient with three months of age and older with 248 months.

Abdominal pain was the major signs and symptoms reported by patients, followed by increased abdominal volume, alopecia, hematuria, fever, weight loss, the presence of palpable abdominal mass, abdominal rhythm changes, diarrhea and dehydration.

The estadio III was more often observed among the patients studied, being identified in 37,11% patients. The I, II, IV and V stages were reported in 12,37%, 20,62%, 9.28% and 1.03%, respectively. In 19,59% patients, the stadium has not been reported in the medical records. The regards survival analysis showed a survival rate of 75,44% (349 months) to patients in stage III, 94,73% (269 months) for those patients in stage II, and 100% (252 months) to patients in stage I. Stage IV patients showed 80% (271 months) of survival rate (Fig. 3).

The protocol used for the treatment of children diagnosed with Wilms' tumor was based in nephrectomy, cycles of chemotherapy and radiotherapy. Patients seem to have responded well to treatment, since only 14 patients were the death (14,43%), while the remaining cases were in remission of the disease (67,01%), in treatment (3,09%), or were considered as waste of thread on leaving clinical outpatient monitoring. The global average survival was 80,29% (349 months) (Fig.3).

3.1.4 Medulloblastoma

51 patients were studied from medical records (Table 5). Most patients with medulloblastoma were male (60,78%) and 39,22% were female. The survival analysis was performed in these patients in relation to gender and the development of the disease, the men sex presented a higher survival rate (61,76%, 236 months) compared to the opposite sex (38,46%, 266 months), however this data did not show statistical significance ($p=0,0756$) (Fig. 4).

The average age of children with medulloblastoma was 110,8 months (9,2 years), The youngest patient was 14 month and the oldest 238 months to diagnosis. The median age of the patients was of 102 months. Five patients (9,8%) were under three years of age. and none of them was the death. However, patients with more than three years old showed a survival rate (50%, 74 months) equivalent to those patients with age less than three years (56,37%, 266 months), but without statistical significance ($p=0,5200$) (Fig. 4).

Headache was present among the complaints from 45,24% patients, vomit in 30,95% of the patients, gait tottering in 14,29%, 9,52% patients referred to strabismus, 4,76% showed hydrocephalus, among other presentations such as weight loss, seizures, fever, nausea, dizziness, vision, etc.

Regarding the spread of the disease, 60,78% of patients with medulloblastoma presented localized disease and 21,57% had metastasized. 54,5% of the patients with disseminated disease have died, displaying a survival rate of 28,57% (112 months). In contrast, patients with localized disease showed survival rate of 59,37% (266 months). This data was statistically relevant ($p= 0,035$).

Between the stages described by Chang et al. (1969), only the T2M0, T3M0, T3aM0, T3bM0, T3M1, T3aM1, T3M2 and T4M0 stadiums were observed among patients studied with medulloblastoma. The T2M0 stadium was more often seen among the cases studied, identified in 29,41%, followed by the T3aM0 stadium (11,76) and T3aM1 (11,76). The T3M0 and T3M1 stages, without subdivision into a and b reported in medical records, were present in 5,88%. The T4M0 stadium was observed at 3,92% and the T3bM0 on 1.96%, while 27,45% of cases had not staging reported. Better survival was associated with the patients in T4M0 stadium (100%, 128 months), followed by T2M0 (66%, 236 months), the T3M0 (55,56%), the T3M1 (37,5%, 128 months) and T3M2 (0%, 5 months), but were not statistically significant ($p=0,0596$).

Patients with medulloblastoma were treated with sessions of chemotherapy and radiotherapy. 41,18% patients are alive without the disease, 3,92% patients are living with the disease, 41,18% patients were died and 13,73% discontinued clinical outpatient follow-up.

3.2 Molecular results and survival analyzes

We studied patients with NB, RB, TW and MB for polymorphisms *MTHFR C677T* and *A1298C*, *MTR A2756G*, *TYMS 2R/3R* and *SCL19A1 G80A*. The genotype distributions (Table 6) were in agreement with Hardy-Weinberg Equilibrium. The number of patients analyzed for each polymorphism and for each tumor and the survival rate is shown in table 6.

In patients with NB, the best survival rate was observed for the genotypes *MTHFR* 677CT (62,04%), *MTHFR* 1298AA (84,04%), *MTR* 2756AA (60,60%), *SLC19A1* 80GG (75%) and *TYMS* 3R/4R (100%) (Figure 5).

The best survival was observed for the genotypes *MTHFR* 677CC (96,66%), *MTHFR* 1298CC (100%), *MTR* 2756AG and GG (100%), *SLC19A1* 80GA (82,75%) and *TYMS* 2R/2R, 2R/4R and 4R/4R (100%) in patients with RB (Figure 6).

The patients with Wilms` tumor presented the *MTHFR* 677TT (100%), *MTHFR* 1298AC (88,23%), *MTR* 2756AG (93,75%), and *SLC19A1* 80GA (82,75%) genotype associated with quietly better survival in relation to *MTHFR* 677CC (91,66%) and 677CT (86,36%), *MTHFR* 1298AA (87,50%) and *MTR* 2756AA (86,66%). The *TYMS* 2R/2R and 3R/3R (100%) showed best survival than *TYMS* 2R/3R (72,72%). The genotype 1298CC, 2756GG and 80GG the genotypes were not observed in the studied population (Figure 7).

Death were not observed for the cases studied MB, so the overall survival was 100%.

But our results were not statistically significant. The *p* value is described in table 6. The relationship between the presence of the allele and the survival rate was analyzed for polymorphisms studied in patients with NB, RT, TW and MB. Only the *MTR* 2756AA allele demonstrated association with a lower survival among patients with RB (Figure 8).

4. DISCUSSION

In this study we analyzed the main clinical and molecular data, arranged in medical records of children with neuroblastoma, retinoblastoma, Wilms' tumor and medulloblastoma. The main analyzed variables were: sex, age, origin, major signs and symptoms, primary site of tumor, metastasis, staging, relevant laboratory parameters, treatment, current state and polymorphisms of folate pathway. The analysis of clinical and molecular features allowed evaluate the biological parameters of these tumors, determine prognostic factors and identify risk factors that influenced in the survival of these patients. Such information, in addition to identifying local characteristics of disease presentation, contribute to the knowledge and assistance to children with cancer in Brazil.

It was not observed a predominance of the male or female sex in patients with neuroblastoma, retinoblastoma and Wilms' tumor. The literature suggests an incidence discreetly higher among male in patients with neuroblastoma (Brodeur and Castleberry, 1993) which differed from results observed. On the other hand, the balance between the two genres seen in the study of retinoblastoma and Wilms' tumor corroborates with previous data (McLean et al., 2010). Affected boys were more often among patients with medulloblastoma, with higher survival rate, but without statistical significance, agreeing with Liu et al. (2005). Thus, the sex cannot be considered as a factor which exerts influence on the predisposition to medulloblastoma, retinoblastoma and Wilms' tumor. However, greater survival for males (49,23%) compared to females (33,49%) was observed among patients with neuroblastoma, suggesting that sex may be a determining factor in the evolution of this malignancy.

The average age of patients with neuroblastoma, retinoblastoma and Wilms tumor agree with literature, which relates to the diagnosis age less than 5 years in patients with neuroblastoma, 2-3 years in patients with retinoblastoma, and 5-6 years for Wilms` tumor. However, patients with medulloblastoma showed age at diagnosis a little higher (9.2 years) to the age reported in the literature (8 years old). The lack of information and low socioeconomic status may contribute to the late diagnosis and consequent advanced disease at diagnosis (Cervoni, 1994; Brodeur, 2003, Mclean et al., 2010). The age is considered prognostic factor important to the development of neuroblastoma, medulloblastoma. Age less than 1 year in patients with neuroblastoma and age greater than three years in patients with medulloblastoma are associated with good prognosis for their tumors, according to Katherine et al. (1999) and Rondinelli et al. (2004). Among patients with neuroblastoma under 1 year old presented greater survival rate in relation to the patients with age greater than one year in the present study, the age was not a statistically significant prognostic factor in determining the survival of patients with neuroblastoma, medulloblastoma.

The signs and symptoms often observed in the present study corroborated with literature, which reports painful masses and abdominal volume increase in neuroblastoma (Golden, et al., 2002), decreased vision and leukocoria in retinoblastoma (Lukusa et al., 2012), pain and abdominal growth in Wilms tumor (Grundy et al., 2002), and headache, vomiting and gait tottering on medulloblastoma (Raffel et al., 2004).

In the present study we evaluated the location of the tumor in patients with neuroblastoma and retinoblastoma, and staging in patients with neuroblastoma

and Wilms ' tumor, but were not considered statistically significant with regard to the survival of these patients and no prognostic relevance.

In this study, was evaluated the location of the tumor in patients with neuroblastoma and retinoblastoma. Tumors with abdominal location were more frequent in patients with neuroblastoma. According to Sung et al. (2009), most cases of neuroblastoma occur in the abdomen and other locations are rarer. Tumors that originate in other sites may have different clinical and biological characteristics. It may be important prognosis, for example, tumors of the mediastinum appear to be more favorable course than abdominal tumors (Sung et al., 2009). Accordingly, this study showed that abdominal tumors were associated with a slightly lower survival rate compared to the patients with extra-abdominal location. However, it differs from that was observed by Jairo et al. (2004) and Schwab et al. (2000), but our results were not statistically significant. The location of the tumor is also an important prognostic factor in patients with retinoblastoma. Our study pointed out a significantly lower survival rate for those with extraocular disease. According to Sethi et al. (2013) and Lukusa et al. (2012), once the neoplasia was disseminated through orbit, optic nerve and central nervous system, eye rescue rates and survival are low, especially in cases of advanced disease at diagnosis installed, when this occurs later.

Is the extent of disease at diagnosis is one of the most important prognostic factors. The spread of the disease was evaluated in patients with retinoblastoma and medulloblastoma. In the present study we observed that patients with retinoblastoma showed infiltration of optic nerve disease and metastases in the bone marrow and central nervous system (CNS) with approximate frequencies to those observed by Alvarado-Castillo et al. (2009). Second Meel et al. (2012),

survival in cases of extraocular disease is smaller, displaying rates between 50% and 70%, in contrast patients with intraocular disease present survival of 95%. This correlation was statistically significant in this work ($p < 0,001$). Patients with extraocular and intraocular manifestation possessed 76,17% and 97,87% survival rate respectively. The survival was significantly lower ($p = 28,57\%$, $p = 0,0350$) when there was spread in patients with medulloblastoma, compared to those patients who have the disease located (59,37%). The presentation of metastatic disease at diagnosis is described by the literature as a criterion to define the high-risk medulloblastoma (Ellison et al., 2011). Thus, the extent of the disease can be considered an impact factor prognosis for retinoblastoma and medulloblastoma.

The staging was evaluated among patients with neuroblastoma, retinoblastoma, Wilms tumor and medulloblastoma. But were not statistically significant to the survival rate for patients with Wilms' tumor and medulloblastoma, not presenting prognostic relevance, in contradiction with the data pointed to by Teixeira et al. (2001), Pogorzala et al. (2014) and Dufour et al. (2012). However, it was relevant among patients with neuroblastoma and retinoblastoma. Evans et al. (1989) also found relevance in relationship between staging and survival for patients with neuroblastoma. Jairo et al. (2004) showed the best prognosis for the stadium I in these patients. Weinstein et al. (2003) noted a survival rate greater than 95% for those with stage I, associating these data to a low-risk disease. He observed also that low rates of cure were associated with more advanced stage and high-risk disease. These data are in agreement with this study in patients with neuroblastoma. The agreement with the literature also was observed in studied patients with retinoblastoma. Advanced stadiums and extraocular disease are

related to a poor prognosis in patients with retinoblastoma, being more commonly observed in cases of late diagnosis (Chantada et al., 2006).

Increase in levels of DHL (>400UI) was verified in patients with neuroblastoma. The survival rate was 43,19% ($p=0,0173$). According to the literature, patients with blood levels of DHL greater than 1500 IU or 2,7 times the normal limit (DHL400UI) are associated with more aggressive disease. On the other hand, Jairo et al. (2004) used median 428 UI as cutting value for statistical evaluation and not observed correlation with worse prognosis. However, this correlation was statistically significant in this study when using the cutting point 400UI, indicating that DHL can be a risk factor that influences on survival of patients with neuroblastoma.

The polymorphisms of genes involved in the folate pathway are frequently associated with the susceptibility of the development (Sharp, 2004). Additionally, in these last years it has been extensively debated the influence of polymorphisms on the clinical response to chemotherapy and toxicity, being considered important prognosis factor for cancer (Biolo et al., 2004).

Chen et al. (2003) showed that polymorphism in the *TYMS* promoter enhancer region may modify the risk and survival of colorectal cancer. Oh et al. (2013) suggest that G/G genotype of VEGF -634 G/C polymorphism is related to the higher serum levels of vascular endothelial growth factor, and poor clinical outcome in advanced gastric cancer patients. Matakidou et al. (2007) said that there is evidence that variation in the folate metabolism genes may influence prognosis from lung cancer. Eissa et al. (2013) presented the effect of C677T and A1298C polymorphisms on methotrexate-related toxicity in adult acute lymphoblastic leukemia and suggests MTHFR polymorphism as an attractive

predictor of MTX-related toxicity in adult ALL, considering it a potential prognostic factor influencing disease outcome. Radtke *et al.* (2013) presented that germline genetic variation in candidate genes of the MTX/folate pathway are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood and conclude that Genetic variations substantially influence the kinetics and response to high-dose MTX therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. D'Àngelo *et al.* (2013) showed the Influence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on the outcome of pediatric patients with non-Hodgkin lymphoma treated with high-dose methotrexate. Your data suggest a pharmacogenetic influence on the adverse effects of high-dose MTX in the 1 g/m² treatment group.

However, the present study is the first to investigate the association of the polymorphism *MTHFR C677T and A1298C*, *MTR A2756G*, *TYMS 2R/3R* and *SLC19A1 G80A* and risk of neuroblastoma, retinoblastoma, wilm's tumor and medulloblastoma. Our observer discreet differences in overall survival rate among the genotypes of the patients studied for each tumor. Although they have been observed differences in survival rates, our results were not statistically significant.

The analysis of the influence of the allele for a worse prognosis and survival were realized on patients with NB, RB, TW and MB. Our results showed that wild and mutant alleles for the studied polymorphisms are not associated with a worse prognosis and a lower survival rate in patients diagnosis with NB, RB, TW and MB, so statistically significant. However, only the *MTR 2756AA* seems to contribute to a lower survival among patients with RB, so statistically significant ($p = 0,0207$) (Figure 9).

A MTR enzyme is essential in maintenance of methionine and folate intracellularly as well as for ensure that the concentrations of homocysteine doesn't reach toxic levels. The enzyme catalyzes a remetilação of homocysteine to methionine through the use of methylcobalamin (vitamin B12) and 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) as co-substratos. The cosubstratos act as donors of methyl groupings in this reaction (Van Der Put et al., 1997).

The most common polymorphism in the gene's MTR A2756G, resulting from a point mutation that leads to a transition from A to G in position 2756pb (2756 A → G) in éxon 8 MTR gene. This mutation leads to replacement of aspartic acid for glycine in codon protein 919. The change of amino acid causes disturbances in three-dimensional structure and protein function with consequent reduction of the activity of MTR. (Ding et al., 2013; Zhao et al., 2013).

So, the presence of polymorphism A2756G probably leads to an accumulation of the substrate to the enzyme, 5-methyltetrahydrofolate, and derived deficiency, including the 5.10-methylenetetrahydrofolate, required for the biosynthesis of timidilatos, as well as the increased level of homocysteine and role of cellular DNA, critical to the maintenance of the intracellular level of S-adenosyl methionine to DNA methylation and cancer suppressor effect (De Lima *et al.*, 2010; Hosseini *et al.*, 2013).

Our results are according with results observed for Serbia *et al.* (2006) who showed that tumours with the MTR wild-type genotype (2756AA) presented a median survival time of 16 months whereas tumours with an MTR variant genotype (2756AG/2756GG) showed a median survival time of 42 months ($p = 0.0463$) Its suggest that prognostic impact could be verified for the presence of 2756AA allele.

So, the MTR 2756AG/2756GG genotypes may have better survival than individuals with the MTR 2756AA genotype in patients with RB into account the effect of this polymorphism on folate metabolism. Other markers not exerted significant influence on the prognosis of tumors NB, RB, WT and MB, does not provide significant predictive information for treated cancer patients. The potential effect of the Methionine Synthase A2756G polymorphism deserves further investigations in similar designed studies.

Further studies involving the treatment time and protocol are required for analyzing of the risks of the polymorphisms and the folate route in pediatric populations, because it would be important to obtain a custom treatment for the patients with polymorphisms unfavorable to the cancer.

The results obtained in this study can be a reflection of the conditions of health care and socioeconomic status and genetic. It is important that new studies to be carried out to evaluate the impact of these variables in the treatment of children with cancer, since there are reports in the literature of children in developing countries are similar to those of developed countries when exposed to ideal conditions of treatment (Brandalise, 2007).

5. REFERENCES

- Alvarado-Castillo B, Campos-Campos LE, Villavicencio-Torres A. (2009) Clinical and metastatic characteristics in retinoblastoma. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 47(2):151-6
- Biolo A, Rohde LE (2004) O impacto dos polimorfismos genéticos e da farmacogenética na avaliação e manejo da insuficiência cardíaca. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul - Ano XIII nº 03 Set/Out/Nov/Dez 2004*
- Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Haddad R et al (2008) The MTR A2756G polymorphism is associated with an increase of plasma homocysteine

- concentration in Brazilian individuals with Down syndrome. *Braz J Med Biol Res* 41 (1): 34-40.
- Brandalise SR (2007) Acute lymphoblastic leukemia in children. *Arch Med Intern. Supl* 1; 29: S92-S5.
- Brenner H, Steliarova-Foucher E and Arndt V. (2007) Up-to-date monitoring of childhood cancer long-term survival in Europe: methodology and application to all forms of cancer combined. *Annals of Oncology* 18: 1561–1568.
- Brodeur GM (2003) *Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. Nat Rev Cancer* 3:203-216.
- Brodeur GM and Castleberry RP (1993) Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 2nd edition. Philadelphia: J. B. Lippincott. 739-768.
- Caroline Laverdie` re, Sonia Chiasson, Irina Costea, Albert Moghrabi, and Maja Krajinovic (2002) Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 100 (10): 3831-3834.
- Cervoni, L; Maleci, A; Salvati, M; Delfini, R; Cantore, G. (1994) Medulloblastoma in late adults: report of two cases and critical review of the literature. *Journal of Neuro-Oncology*. N. 19, P. 169 – 173.
- Chang CH, Housepian EM, Herbert Cjr. *An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas*. *Radiology*; 93, 1351-69, 969.
- Chango A, Emery-Fillon N, Courcy GP et al (2000) A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 70: 310–315.
- Chantada G, Doz F, Antoneli CB, Grundy R, Clare Stannard FF, Dunkel IJ, Grabowski E, Leal-Leal C, Rodriguez-Galindo C, Schwartzman E, Popovic MB, Kremens B, Meadows AT and Zucker JM (2006) A proposal for an international retinoblastoma staging system. *Pediatric Blood Cancer* 47(6):801-805.
- Chen J, Hunter DJ, Stampfer MJ, et al. (2003) Polymorphism in the Thymidylate Synthase Promoter Enhancer Region Modifies the Risk and Survival of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:958-962.
- D'Angelo V, Ramaglia M, Iannotta A, Francese M, Pota E, Affinita MC, Pecoraro G, Indolfi C, Di Martino M, Di Pinto D, Buffardi S, Poggi V, Indolfi P, Casale F (2013) Influence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on the outcome of pediatric patients with non-Hodgkin lymphoma treated with high-dose methotrexate. *Leuk Lymphoma*. 54(12):2639-44.
- David, HA. Retinoblastoma in the 20th Century: Past Success and Future Challenges The Weisenfeld Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. August 2005 vol. 46 no. 8 2684-2691.
- Donaldson, SS. Et al. *Principles and practice of radiation oncology*. 3th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
- Dufour C, Beaugrand A, Pizer B, Micheli J, Aubelle MS, Fourcade A, Couanet D, Laplanche A, Kalifa C and Grill J (2012) Metastatic Medulloblastoma in Childhood: Chang's Classification Revisited. *International Journal of Surgical Oncology*. 2012: 6p.
- Eissa DS, Ahmed TM (2013) C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: effect on methotrexate-related

- toxicity in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 24(2):181-8.
- Ellison DW, Kocak M, Dalton J, Megahed H, Lusher ME, Ryan SL, Zhao W, Nicholson SL, Taylor RE, Bailey S, Clifford SC. (2011) Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *J Clin Oncol*. 29(11), 1400-1407.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R et al (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-113.
- Gilbertson RJ. (2002) Medulloblastoma: signalling a change in treatment. *Lancet Oncol* 2004;5:209-18.
- Grundy PE, Green DM, Coppes MJ, Breslow NE, et al. (2002) Renal tumors In Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 865-93.
- Harmon BE, Friedman K, Nemesure B, Singh M. (2011) Pediatric solid malignant neoplasms: A comparative analysis. *Indian Journal of Pathology & Microbiology* 54 (3) 514-519
- Harmon DL, Shields DC, Woodside JV et al (1999) Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol* 17: 298-309.
- Hishida A, Matsuo K, Hamajima N et al (2003) Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematol* 88: 159-166.
- Jairo C, Cristófani LM, Bendit I, Odone Filho V. (2004) Aspectos clínicos, terapêuticos e variáveis de prognóstico em crianças maiores de um ano portadoras de neuroblastoma não disseminado. *Pediatria*. v.26, n.3, p.159-171.
- Katherine K, Matthay, MD, Villablanca JD, Seeger RC et al. (1999) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *New England Journal of Medicine*. v.341, p.1165-1173.
- Korones DN (2007) *Treatment of newly diagnosed diffuse brain stem gliomas in children: In search of the holy grail*. *Expert Rev Anticancer Ther* 7:663-674
- Liu, Y. et al. (2005) *Japanese Journal of Clinical Oncology*. Radiation treatment for medulloblastoma: a review of 64 cases at a single institute. v. 35, n. 3, p. 111-115.
- Ljungman G, Jakobson A, Behrendtz M, Torben EK, et al. (2011). Incidence and survival analyses in children with solid tumours diagnosed in sweden between 1983 and 2007. *Acta Paediatrica*. 100 (5), 750-757.
- Lukusa AK, Aloni MN, Kadima-Tshimanga B, Mvitu-Muaka et al. (2012) Retinoblastoma in the Democratic Republic of Congo: 20-Year Review from a Tertiary Hospital in Kinshasa. *Journal of Cancer Epidemiology*. 1-5.
- Matakidou A, Galta R, Rudd MF, Webb EL, Bridle H, Eisen T, Houlston RS and the GELCAPS Consortium (2013) Prognostic significance of folate metabolism polymorphisms for lung cancer. *British Journal of Cancer* 97, 247 – 252
- McClean TW and Buckley KS. (2010) Pediatric genitourinary tumors. *Curr Opin Oncol* 22: 268-273.

- Meel, R; Radhakrishnan, V; Bakhshi, S. (2012) Current therapy and recent advances in the management of retinoblastoma. *Indian Journal Of Medical And Paediatric Oncology* 80-88.
- Nascimento EM, Spinelli MO, Rodrigues CJ et al (2003) Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. *J Bras Patol Med Lab* 39(3): 253-255.
- Ongaro A, De Mattei M, Porta MGD, Rigolin G, Ambrosio C, Raimondo FD, Pellati A, Masieri FF, Caruso A, Catozzi L and Donato Gemmati⁵ (2009) Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *haematologica* 94(10).
- Pogorzala M, Styczynski J, Wysocki M (2014) Survival and Prognostic Factors in Children with Brain Tumors: Long-term Follow-up Single Center Study in Poland. *Anticancer Res.* 34(1):323-6.
- Raffel, C. (2004) Medulloblastoma: molecular genetics and animal models. *Neoplasia*. n. 6, P. 310-322.
- Rondinelli PIP; Martinez CAO; Sanematsu JR PI. (2004) Prática Hospitalar. Medulloblastomas: experiência de dez anos do Departamento de Pediatria do Hospital do Câncer de São Paulo. 6(35).
- Sambrook J, Russel DW (2001) Rapid isolation of yeast DNA. In: *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: 631-632.
- Schwab PM; Westermann F; Hero B; Berthold PF (2003) Review - Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The Lancet Oncology*. 4(8):472-480.
- Sethi S, Pushker N, Kashyap S, Sharma S, Mehta M, Bakhshi S, Khurana S and Ghose S (2013) Extraocular retinoblastoma in Indian children: clinical, imaging and histopathological features. *Int. J Ophthalmol* 6(4):481-486.
- Sharp L and Little J (2004) Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 159:423–443
- Steliarova-Foucher E, Coebergh JW, Kaatsch P et al. (2006) (eds). *Cancer in children and adolescents in Europe*. *Eur J Cancer*. 42: 1913–2183.
- Sung KW, Yoo KH, Koo HH, Kim JY, Cho EJ, Seo YL, Kim J and Lee SK. (2009) Neuroblastoma Originating from Extra-abdominal Sites: Association with Favorable Clinical and Biological Features. *J Korean Med Sci* 24: 461-467.
- Teixeira RAP, Bruniera P, Sredni ST and Próspero JD (2001) *Wilms' tumor: clinical, histological and immunohistochemical (p53) evaluation and prognosis*. *Pediatria (São Paulo)*. 23(2):137-45.
- [Uba AF](#), [Chirdan LB](#) (2007) Childhood Wilms' tumour: prognostic factors in North Central Nigeria. [West Afr J Med](#). 26(3):222-5.
- Weinstein J, Katzenstein H and Cohn SL (2003) Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *The Oncologist*. 8:278-292.

Table 1: PCR conditions for the genotype analysis of the folate pathway genes.

POLYMORPHISM	PRIMERS	PCR CONDITIONS	RESTRICTION	AMPLICON	REFERENCE
<i>MTHFR</i> C677T (rs1801131)	Forward: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' Reverse: 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'	95°C – 6 min 95°C – 1 min 62,5°C – 1,30 min 72°C – 1 min 72°C – 2 min	40X <i>HinfI</i>	C Alele: 198bp T Alele: 175; 23bp	Frosst et al., 995
<i>MTHFR</i> A1298C (rs1801133)	A Alele Forward: 5'- GGA GCT GAC CAG TGA AGA -3' A Alele Reverse: 5'- TGT GAC CAT TCC GGT TTG -3' C Alele Forward: 5'- CTT TGG GGA GCT GAA GGA -3' C Alele Reverse: 5'- AAG ACT TCA AAG ACA CTT G -3'	94°C – 2 min 94°C – 30 sec 58°C – 30 sec 72°C – 50 sec 72°C – 5 min	30X -	A Alele: 77bp C Alele: 120bp	Biselli et al.,2008
<i>MTR</i> A2756G (rs1805087)	Forward: 5'-TGT TCC CAG CTG TTA GAT GAA AAT C-3' Reverse: 5'-GAT CCA AAG CCT TTT ACA CTC CTC-3'	95°C – 2 min 94°C – 40 sec 62,5°C – 35 sec 72°C – 35 sec 72°C – 2 min	45X <i>HaeIII</i>	A Alele: 211bp G Alele:131; 80bp	Harmon et al.,1998
<i>TYMS</i> 2R/3R	Forward: 5'-CGT GGC TCC TGC GTT TCC- 3' Reverse: 5'-GAG CCG GCC ACA GGC AT-3'	95°C – 5 min 94°C – 1,5 min 66°C – 30 sec 72°C – 1 min 72°C – 5 min	40X -	2R Alele: 230bp 3R Alele: 248bp	Hishida et al., 2003
<i>SLC19A1</i> G80A (rs1051266)	Forward: 5'-AGT GTC ACC TTC GTC CCC TC-3' Reverse: 5'-CTC CCG CGT GAA GTT CTT-3'	94°C – 5 min 94°C – 35 sec 60°C – 35 sec 72°C – 35 sec 72°C – 7 min	44X <i>HhaI</i>	G Alele: 126; 62; 137bp A Alele: 162 62bp	Chango et al.,2000

Table 2: Clinical characteristics of patients with Neuroblastoma.

Neuroblastoma		Cases (n=51)
Sex, n(%)		
	Male	25 (49,02%)
	Female	26 (50,98%)
Age (Mediam)		37 months
	Male	52 months
	Female	26,5 months
Status, n(%)		
	Alive	24 (47,06%)
	Death	24 (47,06%)
	Loss of follow-up	03 (5,88%)
Stage n(%)		
	I	02 (3,92%)
	II	01 (1,96%)
	III	10 (19,61%)
	IV	31 (60,78%)
	IV S	04 (7,84%)
	No related	03 (5,88%)
DHL, n(%)		
	>400	29 (56,86%)
	≤400	11 (21,57%)
	No related	11 (21,57%)
Age, n(%)		
	≥ 1 ano	44 (86,27)
	< 1 ano	7 (13,73)

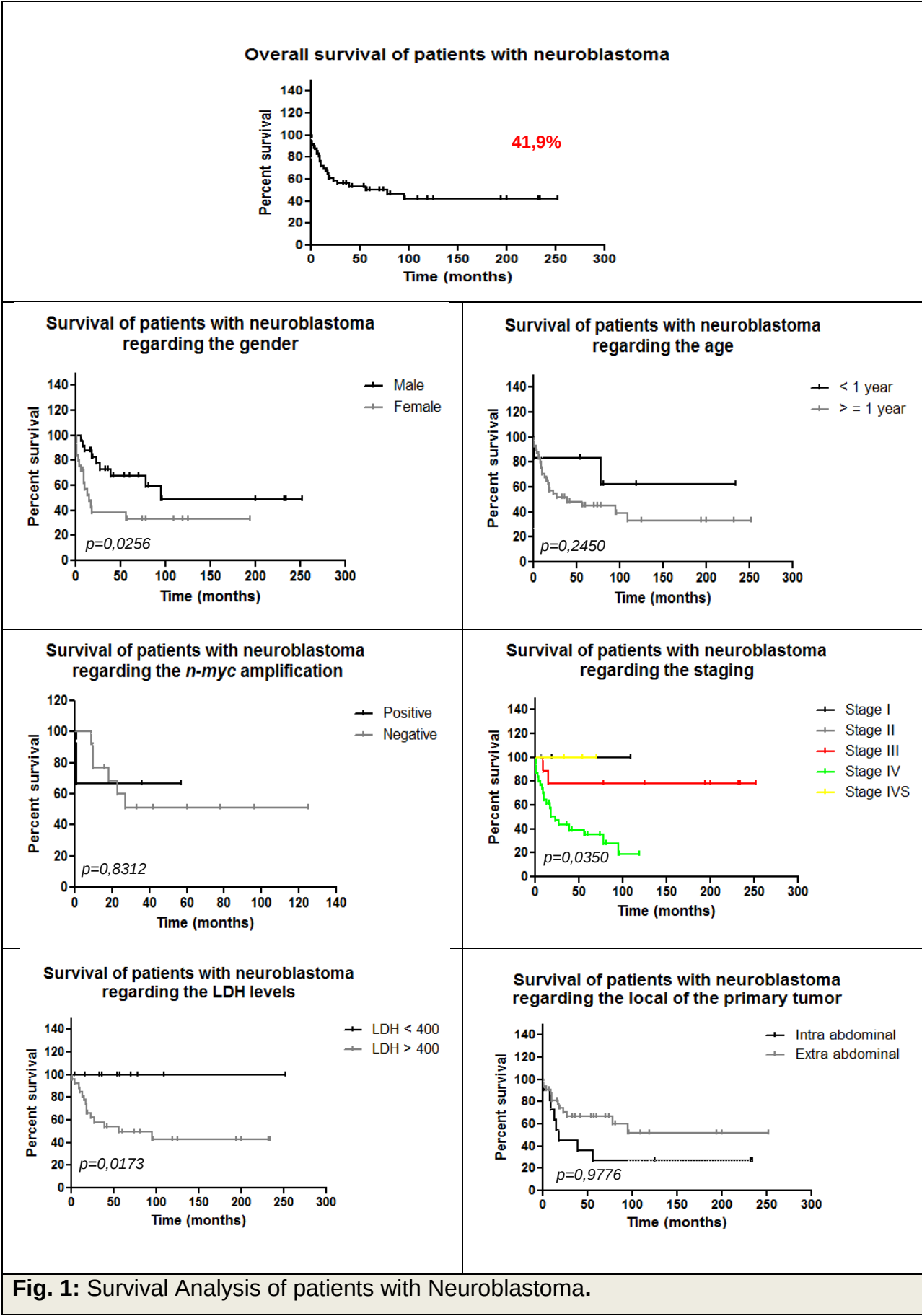


Table 3: Clinical characteristics of patients with Retinoblastoma.

Retinoblastoma		Cases n= (141)
Sex, n(%)		
	Male	72 (51,06%)
	Female	69 (48,94%)
Age (Mediam)		24 months
	Male	27 months
	Female	22 months
Status, n(%)		
	Alive	97 (68,80%)
	Death	33 (23,40%)
	Loss of follow-up	06 (4,25%)
	No Related	05 (3,55%)
Laterality, n(%)		
	Unilateral	86 (60,99%)
	Bilateral	50 (35,46%)
	No Related	05 (3,55%)
Location, n(%)		
	Intraocular	84 (59,57%)
	Extraocular	48 (34,04%)
	No Related	09 (6,38%)
Stage		
	I	44 (31,21%)
	II	51 (36,17%)
	III	35 (24,82%)
	IV	03 (2,13%)
	No Related	08 (5,67%)

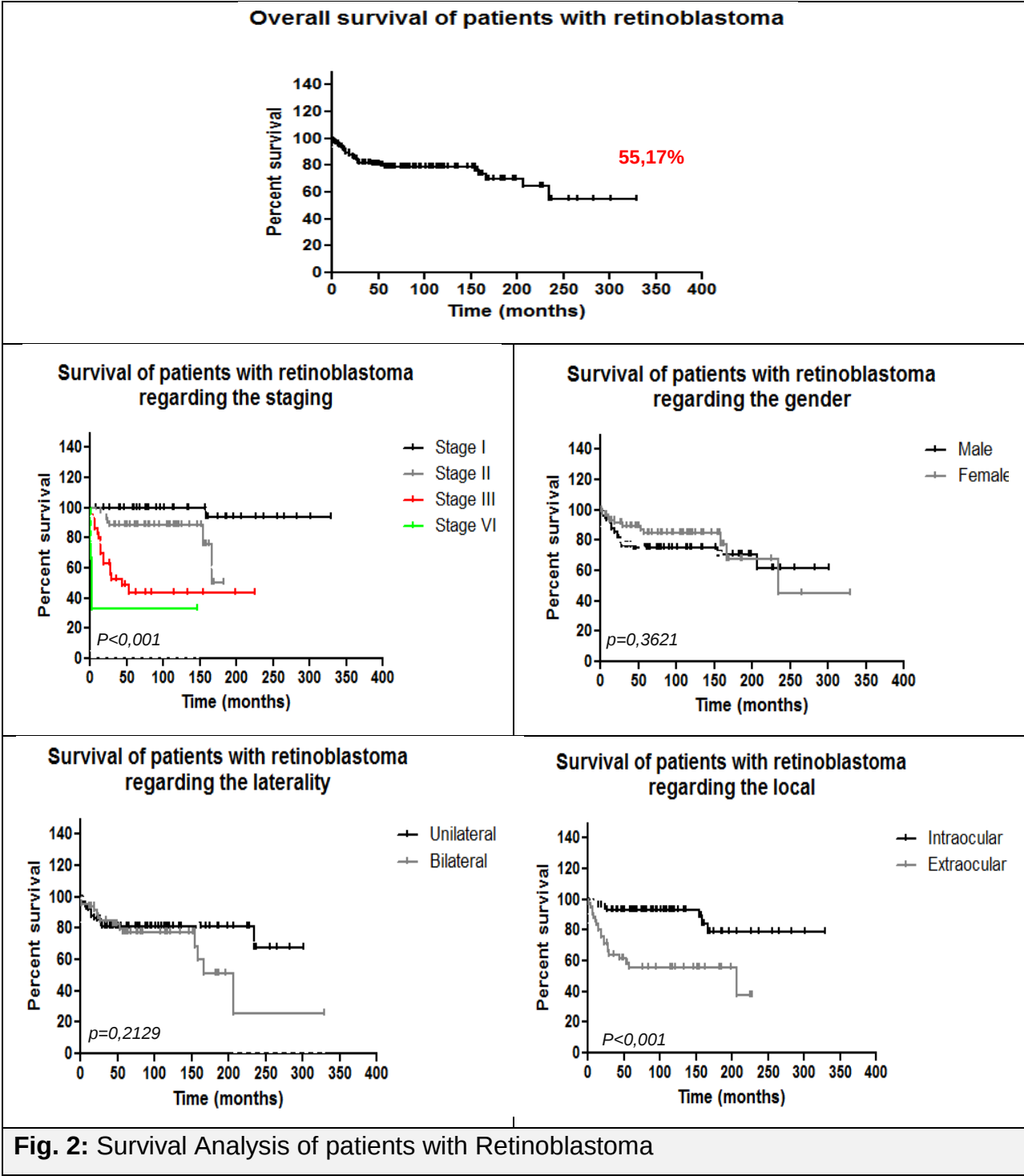


Table 4: Clinical characteristics of patients with tumor de Wilms.

Wilms Tumor		Cases (n= 97)
Sex, n(%)	Male	46 (47,42%)
	Female	51 (52,58%)
Age (Mediam)		48,5 months
	Male	41 months
	Female	51 months
Status, n(%)		
	alive	66 (68,04%)
	death	14 (14,43%)
	loss of follow-up	11 (11,34%)
	No Related	06 (6,19%)
Stage, n(%)		
	I	12 (12,37%)
	II	20 (20,62%)
	III	36 (37,11%)
	IV	09 (9,28%)
	V	01 (01,03)
	No Related	19 (19,59%)
Signs and symptoms, n(%)		
	Abdominal pain, increased abdominal volume	55 (66,27)
	Abdominal mass	04 (04,82)
	Other	24 (28,92)

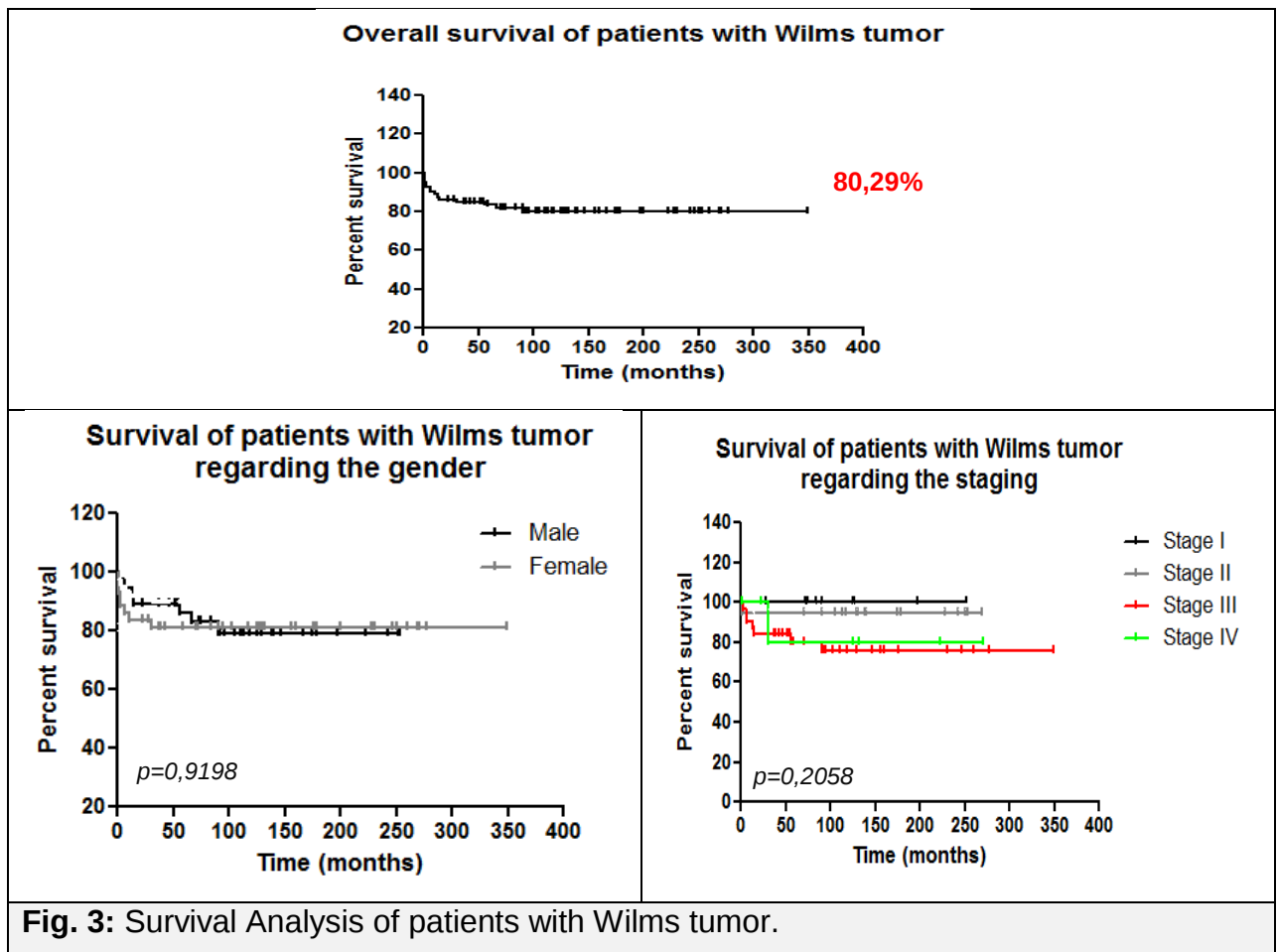


Table 5: Clinical characteristics of patients with medulloblastoma.

Medulloblastoma		Cases (n= 51)
Sex, n(%)		
	Male	31 (60,78%)
	Female	20 (39,22%)
Age (Mediam)		102 months
	Male	107 months
	Female	82 months
Status		
	alive,	23 (45,50%)
	death	21 (41,18%)
	Loss of follow-up	07 (13,73%)
Age		
	< 3 years	05 (09,80%)
	≥ 3 years	46 (90,20%)
Metastasis		
	Yes	11 (21,57%)
	No	31 (60,78%)
	No Related	09 (17,65%)
Recidiva		
	Yes	09 (17,65%)
	No	34 (66,67%)
	No Related	08 (15,69%)
Stage		
	T2M0	15 (29,41%)
	T3M0	03 (5,88%)
	T3aM0	06 (11,76%)
	T3M1	03 (5,88%)
	T3aM1	06 (11,76%)
	T3bM0	01 (1,96%)
	T3M2	01 (1,96%)
	T4M0	02 (3,92%)
	No Related	14 (27,45%)

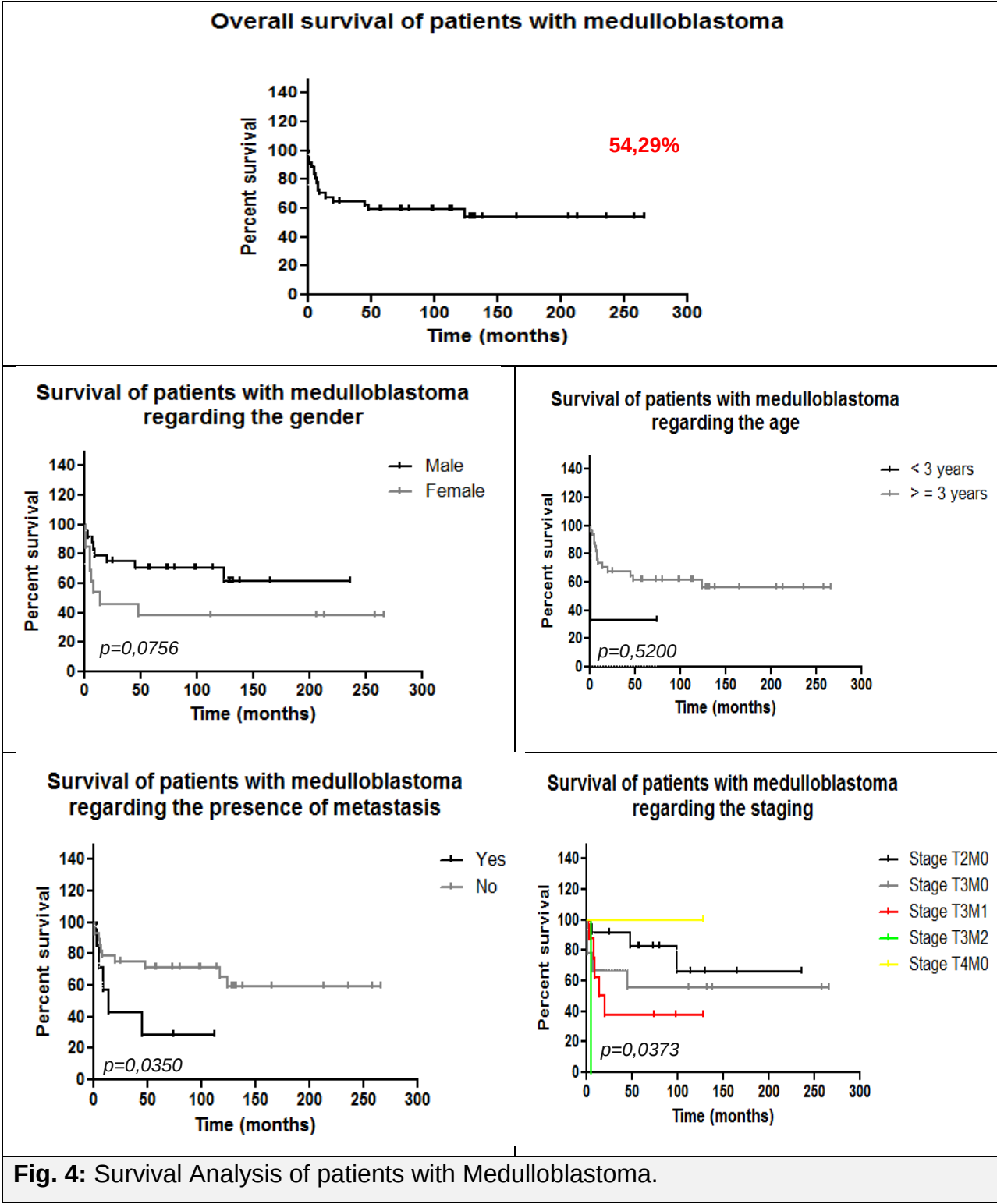
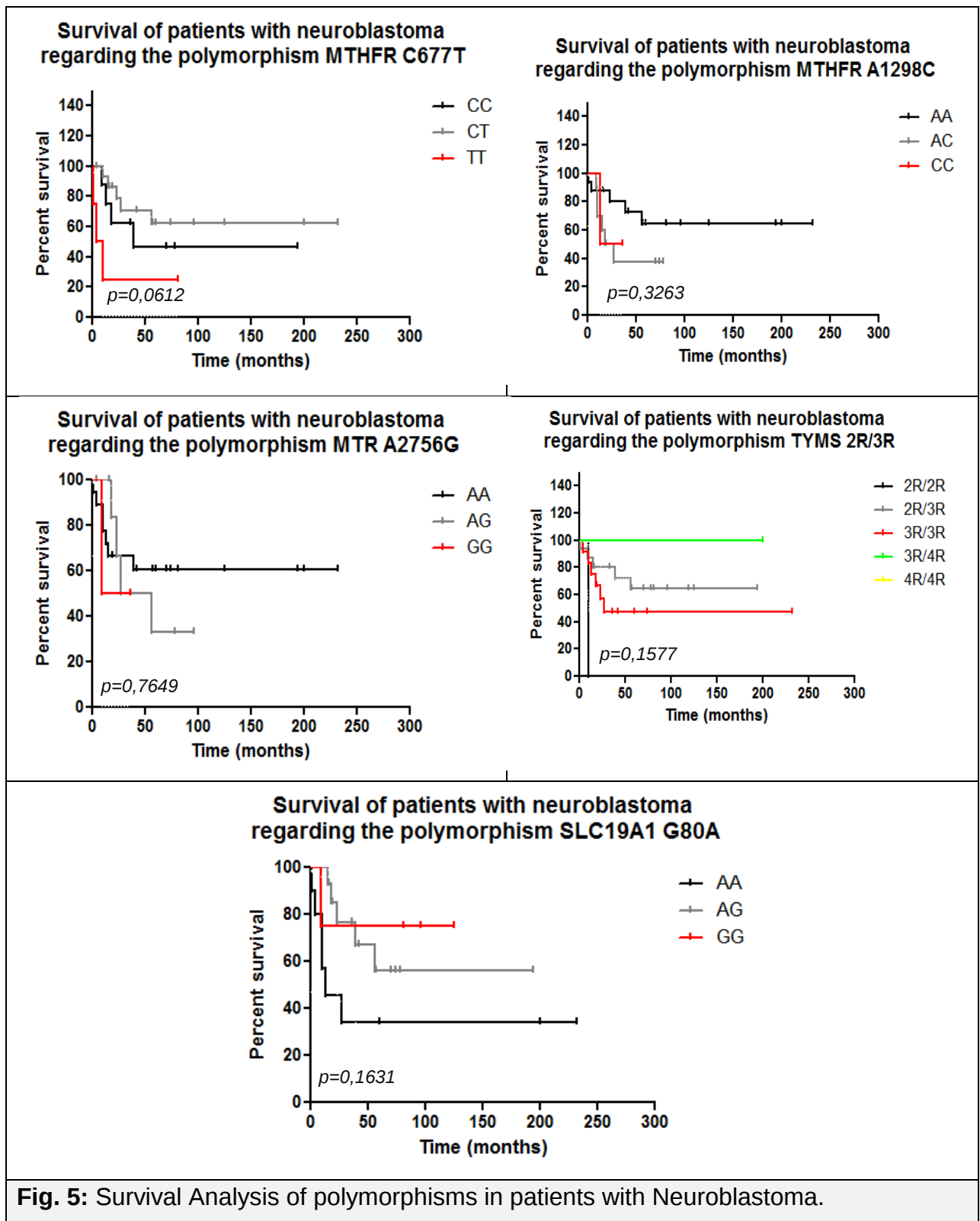


TABLE 6: Genotype distributions and survival in patient with Neuroblastoma, Retinoblastoma, Tumor de Wilms and Medulloblastoma.			
NEUROBLASTOMA - GENOTYPES		FREQUENCIES	SURVIVAL RATE
MTHFR C677T		(n = 28)	p = 0,0612
	CC	08 (28,57%)	46,87% (194 months)
	CT	16 (57,14%)	62,04% (232 months)
	TT	04 (14,29%)	25,00% (81 months)
MTHFR A1298C		(n = 28)	p = 0,3263
	AA	16 (57,14%)	64,81% (232 months)
	AC	10 (35,71%)	37,05% (74 months)
	CC	02 (07,14%)	50,00% (36 months)
MTR A2756G		(n = 28)	p = 0,7649
	AA	18 (64,29%)	60,60% (232 months)
	AG	08 (28,57%)	33,33% (96 months)
	GG	02 (07,14%)	50,00% (36 months)
SLC19A1 G80A		(n = 28)	p = 0,1631
	GG	04 (14,29%)	75,00% (125 months)
	GA	14 (50,00%)	55,85% (194 months)
	AA	10 (35,71%)	34,28 (232 months)
TYMS 2R/3R		(n = 30)	p = 0,1577
	2R/2R	01 (03,33%)	0% (10 months)
	2R/3R	16 (53,33%)	64,28% (194 months)
	3R/3R	12 (40,00%)	47,61% (232 months)
	3R/4R	01 (3,33%)	100% (200 months)
RETINOBLASTOMA - GENOTYPES		FREQUENCIES	SURVIVAL RATE
MTHFR C677T		(n = 83)	p = 0,8851
	CC	32 (38,55%)	96,66% (329 months)
	CT	34 (40,96%)	71,67% (282 months)
	TT	17 (20,48%)	75,00% (225 months)
MTHFR A1298C		(n = 81)	p = 0,8291
	AA	51 (62,96%)	89,52% (282 months)
	AC	25 (30,86%)	42,85% (329 months)
	CC	05 (06,17%)	100% (186 months)
MTR A2756G		(n = 82)	p = 0,1933
	AA	41 (50,00%)	61,32 (329 months)
	AG	35 (42,68%)	100% (282 months)
	GG	06 (07,32%)	100% (183 months)
SLC19A1 G80A		(n = 80)	p = 0,7298
	GG	20 (25,00%)	50,00% (265 months)
	GA	36 (45,00%)	82,75% (329 months)
	AA	24 (30,00%)	50,00% (265 months)
TYMS 2R/3R		(n = 83)	p = 0,7569
	2R/2R	11 (13,25%)	100% (225 months)
	2R/3R	40 (48,19%)	77,94% (329 months)
	3R/3R	25 (30,12%)	66,66% (265 months)
	2R/4R	03 (03,61%)	100% (199 months)
	3R/4R	03 (03,61%)	66,66% (76 months)
	4R/4R	01 (01,20%)	100% (162 months)
WILMS TUMOR - GENOTYPES		FREQUENCIES	SURVIVAL RATE
MTHFR C677T		(n = 35)	p = 0,8642
	CC	12 (34,29%)	91,66% (246 months)
	CT	22 (62,86%)	86,36% (277 months)
	TT	01 (02,86%)	100% (231 months)
MTHFR A1298C		(n = 25)	p = 0,9989
	AA	08 (32,00%)	87,50% (129 months)
	AC	17 (68,00%)	88,23% (277 months)
	CC	-	-

MTR A2756G		(n = 31)	p = 0,4864
	AA	15 (48,39%)	86,66% (269 months)
	AG	16 (51,61%)	93,75% (277 months)
	GG	-	-
SLC19A1 G80A		(n = 8)	p = 0,5780
	GG	-	-
	GA	07 (87,50%)	71,42% (92months)
	AA	01 (12,50%)	100% (231 months)
TYMS 2R/3R		(n = 21)	p = 0,2580
	2R/2R	03 (14,29%)	100% (200 months)
	2R/3R	11 (52,38%)	72,72% (277 months)
	3R/3R	06 (28,57%)	100% (269 months)
MEDULLOBLASTOMA - GENOTYPES		FREQUENCIES (n = 14)	SURVIVAL RATE
MTHFR C677T		(n = 11)	p = -
	CC	05 (45,45%)	100% (128 months)
	CT	03 (27,27%)	100% (213 months)
	TT	04 (36,36%)	100% (236 months)
MTHFR A1298C		(n = 11)	p = -
	AA	06 (54,55%)	100% (236 months)
	AC	05 (45,55%)	100% (213 months)
	CC	01 (09,09%)	100% (94 months)
MTR A2756G		(n = 11)	p = -
	AA	08 (72,73%)	100% (213 months)
	AG	02 (18,18%)	100% (236 months)
	GG	01 (09,09%)	100% (25 months)
SLC19A1 G80A		(n = 11)	p = -
	GG	02 (18,18%)	100% (213 months)
	GA	07 (63,64%)	100% (236 months)
	AA	02 (18,18%)	100% (128 months)
TYMS 2R/3R		(n = 11)	p = -
	2R/2R	01 (09,09%)	100% (236 months)
	2R/3R	08 (72,73%)	100% (213 months)
	3R/3R	02 (18,18%)	100% (128 months)



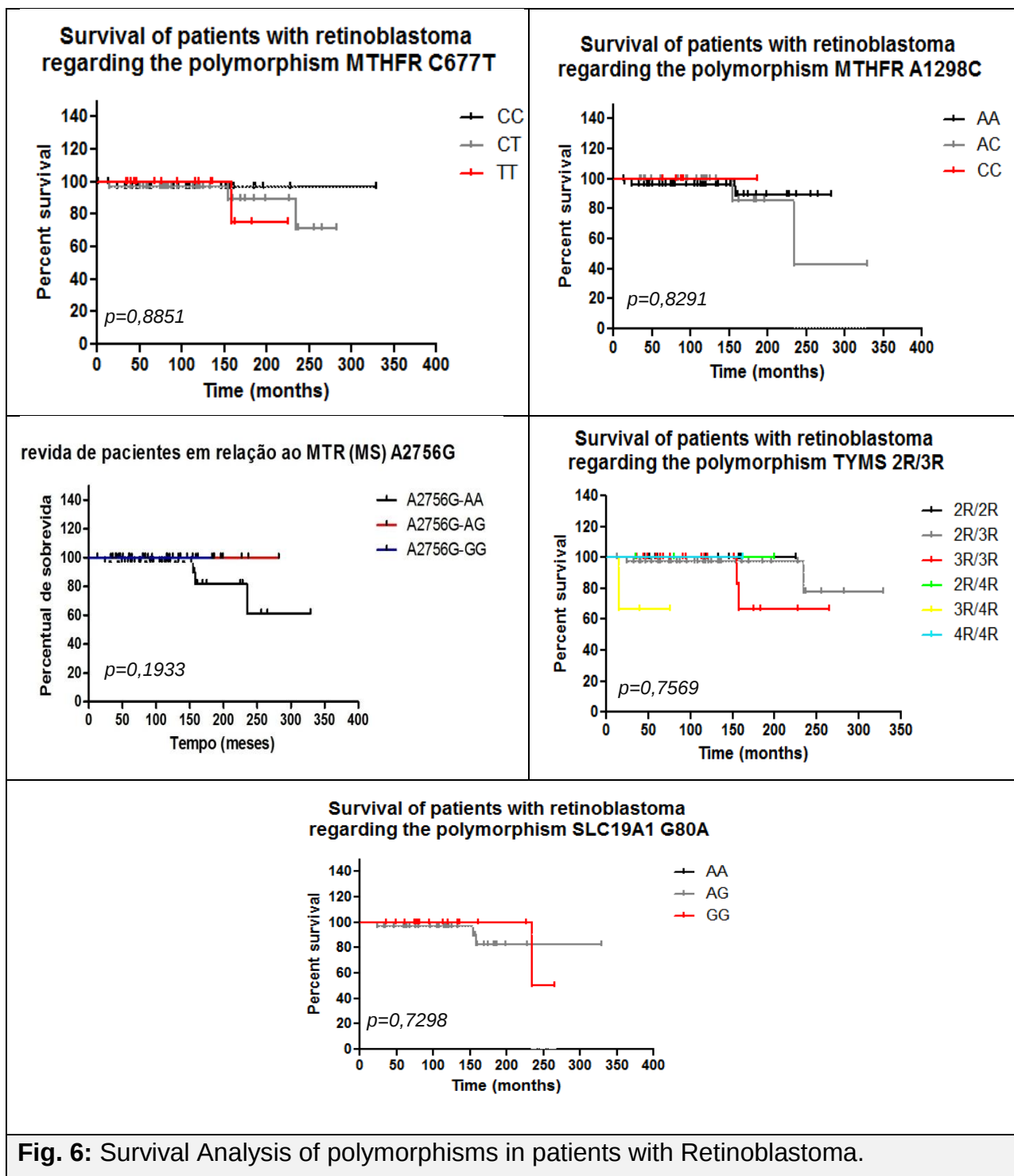
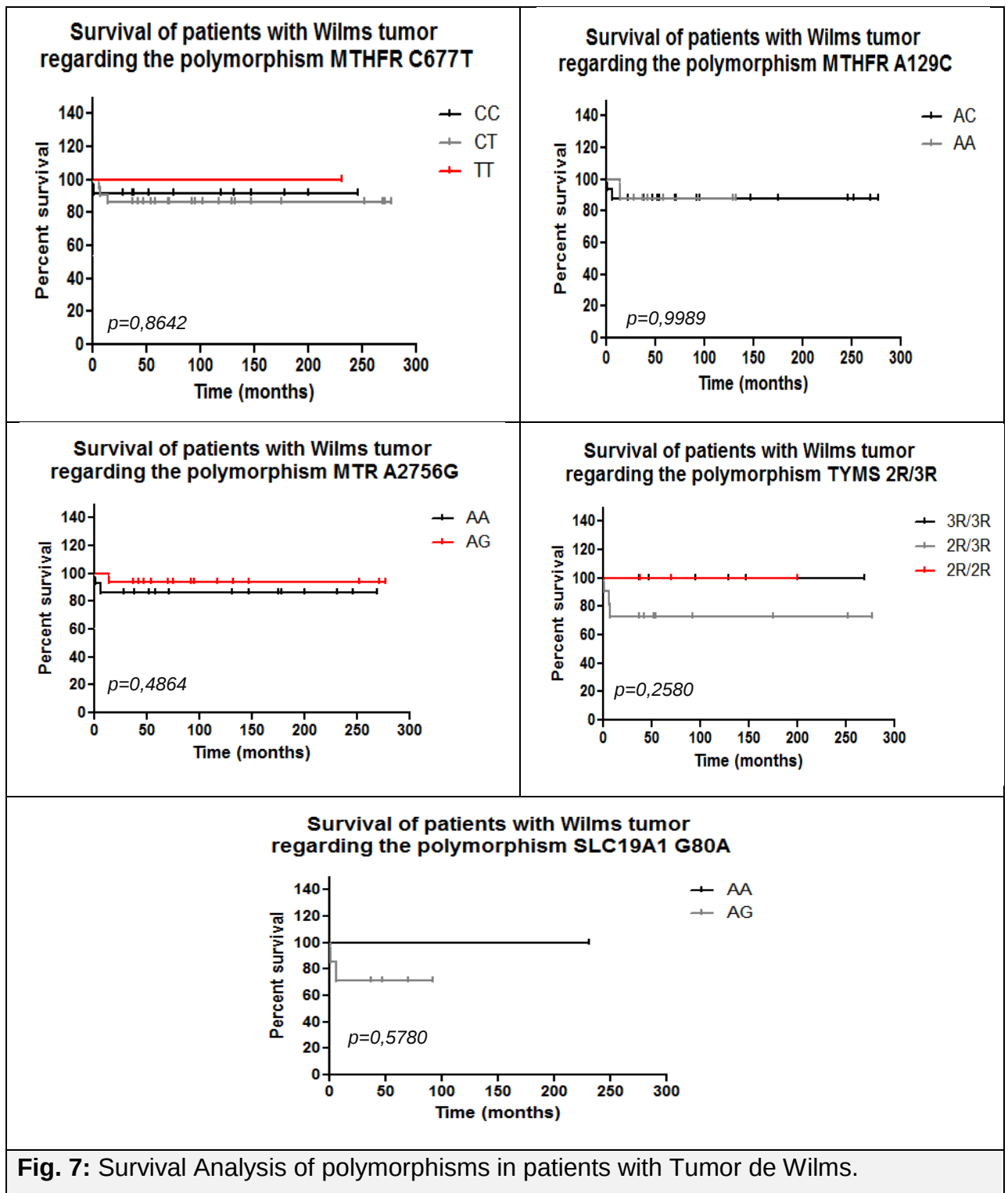


Fig. 6: Survival Analysis of polymorphisms in patients with Retinoblastoma.



**Survival of patients with retinoblastoma
regarding the presence of the mutant allele MTR A2756G**

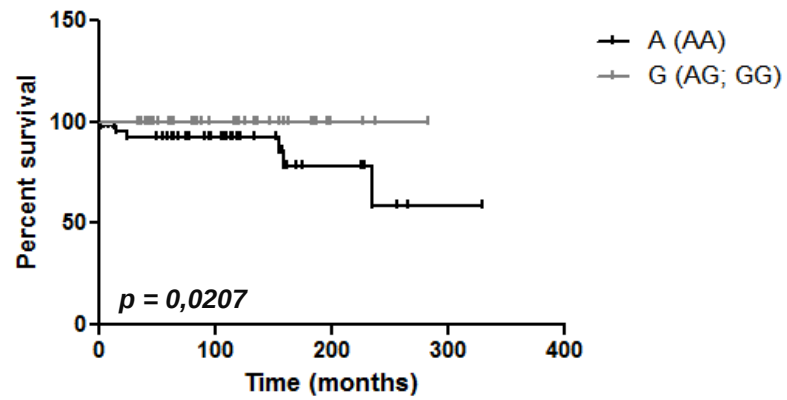


Fig. 8: Survival analysis of patients with retinoblastoma regarding the presence of the mutant allele *MTR A2756G*.

ANEXO 4

Reduced folate carrier-1 G80a gene polymorphism is associated with neuroblastoma's development

Dyego O. de Miranda · Jemima E. X. S. Barros · Maria Madalena S. Vieira ·
Elker L. S. Lima · Vera L. L. Moraes · Helker A. da Silva · Helder L. B. O. Garcia ·
Cláudia A. Lima · Adriana V. Gomes · Neide Santos · Maria T. C. Muniz

Received: 20 February 2013 / Accepted: 6 January 2014 / Published online: 27 April 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Neuroblastoma is a malignant embryonal tumor of neural crest cells that give rise to the sympathetic nervous system, responsible for 10–70 % of all cases of childhood cancer. Because of its early appearance, it has been suggested that risk factors active in the prenatal can be associated with the pathogenesis of neuroblastoma. The aim of this study was to investigate whether the genetic polymorphisms *MTHFR* C677T and A1298C, *MTR* A2756G, *TYMS* 2R/3R and *SLC19A1* G80A, involved in folate metabolism, increase the risk of neuroblastoma in Brazilian children. This study comprised 31 Brazilian children (0–14 years old) diagnosed with neuroblastoma

compared with 92 controls. Investigation of polymorphisms *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G and *SLC19A1* A80G was performed using PCR-RFLP, the *TYMS* 2R/3R using PCR and *MTHFR* A1298C using AS-PCR. The *SLC19A1* A80A genotype was significantly associated with the development of neuroblastoma, compared with the control group (Williams G-Test = 0.0286; OR = 5.1667; 95 % CI = 1.4481–18.4338; $p = 0.0175$). When analyzed together, the 80AG+AA genotypes showed a trend toward association (OR = 3.3033; 95 % CI = 1.0586–10.3080; $p = 0.0563$). Our results suggest that individuals carriers of genotype AA for the *SLC19A1* gene present risk for the

D. O. de Miranda · J. E. X. S. Barros ·
M. M. S. Vieira · E. L. S. Lima · V. L. L. Moraes ·
H. A. da Silva · C. A. Lima · A. V. Gomes · M. T. C. Muniz
Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Oncobiomedicina
Pediatrica (CEONHPE), Hospital Universitário Oswaldo Cruz –
HUCC/UFPE, Universidade de Pernambuco – UPE, Araribá
Marques, 310 - Santo Amaro, Recife 50100-130, Pernambuco,
Brazil
e-mail: dyegomiranda@hotmail.com

J. E. X. S. Barros
e-mail: jemimaoliveira@gmail.com

M. M. S. Vieira
e-mail: madalena.vieira@hotmail.com

E. L. S. Lima
e-mail: elkarlima@yahoo.com.br

V. L. L. Moraes
e-mail: veramoraes02@hotmail.com

H. A. da Silva
e-mail: helker_silvasuperapo@yahoo.com.br

C. A. Lima
e-mail: Arantes.camilia@yahoo.com.br

A. V. Gomes
e-mail: adriana.vieiragomes@gmail.com

D. O. de Miranda · A. V. Gomes · M. T. C. Muniz (✉)
Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade de
Pernambuco – UPE, Araribá Marques Street, 310,
Santo Amaro-Recife, PE 50100-130, Brazil
e-mail: mcartano.upo@gmail.com

J. E. X. S. Barros · H. A. da Silva
Departamento de Genética, Universidade Federal de
Pernambuco – UFPE, Cidade Universitária, Brazil

M. M. S. Vieira · C. A. Lima · A. V. Gomes · N. Santos ·
M. T. C. Muniz
Faculdade de Ciências Médicas – FCM, Universidade de
Pernambuco – UPE, Santo Amaro, Brazil
e-mail: santos_neide@yahoo.com.br

H. A. da Silva
Campus Petrolina – Universidade de Pernambuco – UPE,
Petrolina, Brazil

H. L. B. O. Garcia
Fundação Getúlio Vargas – FGV, Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: holder.garcia@gmail.com

development of neuroblastoma and possibly have difficulty in absorption of folic acid by the cells, and this may adversely affect the metabolism of folate causing genomic instability and promoting the development of cancer. This is the first retrospectively/prospective study to examine the relationship between polymorphisms of folate pathway genes and risk of neuroblastoma.

Keywords Reduced Folate Carrier-1 · G80A polymorphism · Neuroblastoma · *SLC19A1* gene

Introduction

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in childhood [1]. NB is a malignant tumor consisting of undifferentiated neuroectodermal cells derived from the neural crest [2], characterized by tremendous clinical heterogeneity, in which some tumors are extremely aggressive, whereas others spontaneously differentiate into benign forms [3]. About half of all NB arise in the adrenal medulla and the rest originate in paraspinal sympathetic ganglia in the chest or abdomen or in the pelvic ganglia. Neuroblastomas account for 7–10 % of all childhood cancers, and it is the most common cancer diagnosed in the first 5 years [2, 4, 5]. Because of its appearance very early in life, it has been suggested that risk factors that act prenatally could play a role in the pathogenesis of neuroblastoma [6].

Disruptions in the folate-mediated one-carbon metabolic network are common and result from single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes encoding enzymes of the folate pathway or low intracellular concentrations of this vitamin [7, 8]. Approximately 20–60 % of cancer worldwide has been estimated to be associated with nutritional factors [9] and among the most extensively studied nutrients involved in cancer etiology is the vitamin folic acid. A possible role of folic acid in the development of neuroblastoma was suggested by French et al. [10]. Polymorphisms in folate metabolism genes have been associated as risk for many cancers [11–15]. The main polymorphisms are: the A80G polymorphism in *SLC19A1* gene, which encodes the reduced folate carrier-1 (RFC-1), the SNP A2756G in *MTR* gene responsible to encode methionine synthase (MS) and the C677T and A1298C polymorphisms in the *MTHFR* gene, which has the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a product [16–19]. Besides SNP, a double (2R) or triple (3R) 28-base pair (bp) repeat sequence in the promoter/enhancer region of the *TYMS* gene, which encodes thymidylate synthase (TS) was also associated with the appearance of tumors [20]. Folate deficiency was associated with massive misincorporation of uracil into DNA and subsequent chromosomal breaks in

humans, presumably because of deficient methylation of dUMP to dTMP [21]. Failure to repair chromosomal breaks may lead to genomic instability [22], which is a hallmark of progression to invasive cancer and metastatic progression of tumors [23]. The aim of this study was to investigate whether the genetic polymorphisms *MTHFR* C677T and A1298C, *MTR* A2756G, *TYMS* 2R/3R and *SLC19A1* G80A, involved in folate metabolism, increase the risk of neuroblastoma in children.

Materials and methods

Population characteristics

This study comprised 31 children (0–14 years old) diagnosed with neuroblastoma from Centro de Oncobematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (CEONHPE-HUOC) Brazil, between 1993 and 2011. 92 Healthy subjects (8 months to 18 years) with no history of cancer, originating from the same geographical region were recruited as controls. The study protocol was approved by the ethics committee (CAAE: 059.0.106.000-10) in Human Research Hospital Complex HUOC/PROCAPE, and signed informed consent was obtained from all guardians and/or participants.

The frequency of patients with neuroblastoma treated at the CEONHPE-HUOC, although it is considered a regional referral hospital, is low (five child/year), reflecting in a small number of patients analyzed in this study.

Samples

Peripheral blood samples were collected in tubes containing EDTA (BD Vacutainer, Preanalytical Solutions, Franklin Lakes, NJ) and were immediately transported to the laboratory on ice. Tumors were obtained by surgical resection and transported in RPMI medium. Tumor samples embedded in paraffin blocks were used for dead patients.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by phenol–chloroform method for molecular analysis adapted from Sambrook and Russell [24]. The DNA extraction from tumor samples in paraffin blocks was realized according to Nascimento et al. [25].

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR conditions for the genotype analysis are shown in Table 1. The amplified alleles for all polymorphisms were visualized on agarose gel 3 % after enzymatic digestion.

1 PCR conditions for the genotype analysis of the folate pathway genes

Polymorphism	Primers	PCR conditions	Restriction	Amplicon	References
MTHFR C677T (rs1801133)	Forward: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' Reverse: 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'	95 °C—6 min 95 °C—1 min 62.5 °C—1.30 min 72 °C—1 min	<i>HhaI</i>	C Allele: 198 bp T Allele: 175; 23 bp	[18] (Adapted)
		72 °C—2 min 40 ^a			
		A Allele Forward: 5'-GGA GCT GAC CAG TGA AGA-3'		A Allele: 77 bp	
		A Allele Reverse: 5'-TGT GAC CAT TCC GGT TTG-3'		C Allele: 120 bp	
MTHFR A1298C (rs1801133)	A Allele Forward: 5'-GGA GCT GAC CAG TGA AGA-3' A Allele Reverse: 5'-TGT GAC CAT TCC GGT TTG-3' C Allele Forward: 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA-3' C Allele Reverse: 5'-AAG ACT TCA AAG ACA CTT G-3'	94 °C—2 min 94 °C—30 s 58 °C—30 s 72 °C—30 s	-		[28] (Adapted)
		72 °C—5 min 30 ^b			
MTR A2756G (rs1805087)	Forward: 5'-TGT TCC CAG CTG TTA GAT GAA AAT C-3' Reverse: 5'-GAT CCA AAG CCT TTT ACA CTC CTC-3'	95 °C—2 min 94 °C—40 s 62.5 °C—35 s 72 °C—35 s 72 °C—2 min 45 ^c	<i>HaeIII</i>	A Allele: 211 bp G Allele: 131; 80 bp	[27] (Adapted)
TYMS 2R/3R	Forward: 5'-CGT GGC TCC TGC GTT TCC-3' Reverse: 5'-GAG CCG GGC ACA GGC AT-3'	95 °C—5 min 94 °C—1.5 min 66 °C—30 s 72 °C—1 min 72 °C—5 min 40 ^d	-	2R Allele: 230 bp 3R Allele: 248 bp	[28] (Adapted)
SLC19A1 G80A (rs1051266)	Forward: 5'-AGT GTC ACC TTC GTC CCC TC-3' Reverse: 5'-CTC CCG CGT GAA GTT CTT-3'	94 °C—5 min 94 °C—35 s 60 °C—35 s 72 °C—35 s 72 °C—7 min 44 ^e	<i>HhaI</i>	G Allele: 126; 62; 137 bp A Allele: 162; 62 bp	[16] (Adapted)

^a 40X^b 30X^c 45X^d 40X^e 44X

Statistical analysis

The differences in genotype frequencies of *MTHFR* C677T and A1298C, *MTR* A2756G, *TYMS* 2R/3R and *SLC19A1* A80G polymorphisms between the patients and the controls were compared using Williams G-Test at significant level of 5 %. Odds ratios (ORs) and 95 % confidence intervals (CIs) were used to measure the strength of association between genotype frequency and neuroblastoma's development. Hardy–Weinberg equilibrium was tested for each SNP by comparing observed with expected

frequencies using χ^2 test. For this analysis we used the statistical programs BioEstat 5.3 software (Belém, PA, Brazil). We tested Pearson's test of linear correlation and additive model (Cochran–Armitage test) using Sofa-Statistic 1.3.

Results

In total of 31 patients with neuroblastoma, 17 were male (54.8 %) and 14 were female (45.2 %) subjects. In the

control group of 92 individuals, 40 were male (43.5 %) and 52 were female (56.5 %) subjects. The median age of patients was 31 months (43.5 and 26 for male and female subjects, respectively) and 152 months for controls (132 and 120 for male and female subjects, respectively).

The genotypic frequencies of each polymorphism between patients and control are shown in Table 2. Allele frequencies for each polymorphism in both patients and controls were in accordance with the Hardy–Weinberg equilibrium. Because of technical difficulties, some patients were not genotyped, which show little variation in the number of patients genotyped for each one of the polymorphisms. We analyzed, in patients and controls group, the polymorphisms *MTHFR* C677T and A1298C, *MTR* A2756G, *SLC19A1* G80A, and *TYMS* 2R/3R, where the most common genotypes were CT (58.7 %), AA (59.3 %), AA (64.5 %), AG (46.7 %), and 2R/3R (51.7 %) in patients and (52.2 %), AA (56.5 %), AA (73.9 %), AG (46.7 %), and 2R/3R (48.9 %) in the control group CT, respectively. For the *TYMS* (2R/3R) polymorphism, a 4R tandem repeat also exists. However, it appears more rarely among the individuals. We decide to maintain this allelic variant together with 3R tandem repeat, which promotes a higher gene expression. There were no associations between *MTHFR* (C677T and A1298C), *MTR* (A1298C) and *TYMS* (2R/3R) with neuroblastoma's development when compared with the control group. For the *SLC19A1* (RFC1) G80A polymorphism, the genotype frequencies of GG, AG, and AA in the patients were 13.3, 46.7, and 40 %, respectively, whereas in controls 33.7, 46.7, and 19.6 %, respectively. The *SLC19A1* AA was significantly associated with the development of neuroblastoma, compared with the control group (OR 5.1667; 95 % CI 1.4481–18.4338; $p = 0.0175$; Pearson's Test of Linear Correlation = 0.0270). We also analyzed together the AG+AA genotypes, in order to evaluate if the presence of the "A" variant by itself, influence in the risk of development of neuroblastoma. This combination showed a slight tendency for association (OR 3.3033; 95 % CI 1.0586–10.3080; $p = 0.0563$).

Discussion

In this study, the hypothesis that polymorphisms in genes *MTHFR*, *MTR*, and *TYMS*, as well as in the *SLC19A1* gene, influence the risk of developing neuroblastoma was evaluated. This is the first retrospective/prospective study to examine the relationship between polymorphisms of folate pathway genes and risk of neuroblastoma.

In relation to characteristics such as gender and age, the number of male patients was slightly higher than the female, which corroborates with findings in the literature, where there is a 1.2:1 ratio of males and females [29, 30].

No association was found among the *MTR* A2756G, 2R/3R, *TYMS*, *MTHFR* A1298C, and C677T polymorphisms and risk of neuroblastoma. In a previous study from our group, we found that the *MTR* A2756G polymorphism was associated with increased susceptibility for developing retinoblastoma, a common solid tumor in Brazilian children [14]. Sirachainan et al. [13] analyzed the same polymorphisms in Thai children with tumors of the central nervous system (but not in neuroblastoma) and reported that the homozygous *MTHFR* 1298CC conferred risk for the development of these tumors.

In this study, the AA genotype of the *SLC19A1* gene was associated with the development of neuroblastoma. The *SLC19A1* gene encodes the reduced folate carrier 1 (RFC1), responsible for the absorption of folate by the cell [16]. The RFC1 can be considered the most important transport system for folates and antifolates in mammalian cells and tissues [31]. Low levels of folate cause uracil misincorporation in DNA because of a decrease of 5,10-methylene tetrahydrofolate, necessary compound for thymidylate synthase [21], and this inadequate incorporation is linked to the double-stranded breaks DNA. Additionally, flaws in the repair of chromosomal breaks can cause genomic instability, which is a feature of invasive cancers and progression of tumor metastases [23]. To maintain adequate levels of folate within the cell, it is necessary that the mechanism that regulates the absorption is extremely functional. Chang et al. [16] reported a higher frequency of G80A SNP in the *SLC19A1* gene in healthy subjects. The *SLC19A1* A80A and *MTHFR* C677T had higher plasma levels of folate than G80G/C677T patients ($p = 0.02$). It is believed that changing the amino acid Arg27His in the first transmembrane domain (TMD1) of the protein, caused by the G80A substitution, may alter the transport properties of RFC1. The exact effects caused by the polymorphism on the protein remain unknown [32].

According to the literature, the G80A polymorphism in the *SLC19A1* gene was associated with the development of several diseases, including neural tube defects (NTDs). High frequency of G allele was found in children born with NTD [33–36].

Studying *Xenopus* embryos, Li et al. [37] showed that the RFC-mediated folate metabolic pathway likely potentiates neural crest gene expression through epigenetic modifications. Furthermore, defects in XRFC may result in various neurocristopathies, which further strengthens our hypothesis about the involvement of RFC1 on the development of neuroblastoma, as it consists of undifferentiated neuroectodermal cells derived from neural crest [2].

In cancer, *SLC19A1* G80A polymorphism has a causal association, apparently with esophageal and gastric cancer [38]; however, other studies found no association with colon cancer [15] and non-Hodgkin lymphoma [39].

2 Genotypic frequencies of each polymorphisms in Brazilian children with neuroblastoma and healthy control

Polymorphisms	Genotypes	Patients (%)	Controls (%)	P ^a	OR (CI 95 %)	p ⁺⁺
<i>MTWFR</i> (C677T)	CC	09 (31.0)	37 (40.2)	0.6607	1	
	CT	17 (58.7)	48 (52.2)		1.4560 (0.5833–3.6343)	0.5620
	TT	03 (10.3)	07 (07.6)		1.7619 (0.3791–8.1878)	0.7614
	CT + TT	20 (69.0)	55 (59.8)		1.4949 (0.6137–3.6404)	0.5035
Trend test ^b				0.4128		
Allele	C	35 (60.3)	122 (66.3)			
Allele	T	23 (39.6)	62 (33.7)			
<i>MTWFR</i> (A1298C)	AA	16 (50.3)	52 (56.5)	0.9413	1	
	AC	09 (33.3)	34 (37.0)		0.8603 (0.4614–2.8285)	0.6914
	CC	02 (07.4)	06 (06.5)		1.0833 (0.1988–5.9040)	0.7286
	AC+CC	11 (40.7)	40 (43.5)		0.8938 (0.3739–2.1362)	0.9748
Trend Test ^b				0.9035		
Allele	A	41 (75.9)	138 (75.0)			
Allele	C	13 (24.1)	46 (25.0)			
<i>MTR</i> (A2756G)	AA	20 (64.5)	68 (73.9)	0.3023	1	
	AG	09 (28.0)	23 (25.0)		1.3304 (0.5313–3.3313)	0.7116
	GG	02 (06.5)	01 (01.1)		6.8000 (0.5858–78.9371)	0.2881
	AG+GG	11 (35.5)	24 (26.1)		1.5583 (0.6525–3.7207)	0.4397
Trend Test ^b				0.2090		
Allele	A	49 (79.0)	136 (86.4)			
Allele	G	13 (21.0)	25 (13.6)			
<i>TYMS</i> (2R/3R)	2R	01 (03.4)	16 (17.4)	0.0995	1	
	2R/3R	15 (51.7)	45 (48.9)		6.2609 (0.7204–54.4042)	0.1425
	3R (4R)	13 (44.0)	31 (33.7)		6.7097 (0.8041–55.9880)	0.0029
	2R/3R + 3R (4R)	28 (96.0)	76 (82.6)		5.8947 (0.7466–46.5406)	0.1146
Trend test ^b				0.0842		
Allele	2R	17 (29.3)	77 (42.0)			
Allele	3R (4R)	41 (70.7)	107 (58.0)			
<i>SLC7B9A1</i> (G80A)	GG	04 (13.3)	31 (33.7)	0.0286*	1	
	AG	14 (46.7)	43 (46.7)		2.5233 (0.7574–8.4087)	0.2038
	AA	12 (40.0)	18 (19.6)		5.1667 (1.4481–18.4338)	0.0175*
	AG+AA	26 (86.7)	61 (66.3)		3.3033 (1.0586–10.3080)	0.0403*
Trend test ^b				0.0012		
Allele	G	22 (36.7)	105 (57.0)			
Allele	A	38 (63.3)	79 (43.0)			

^a Cochran-Armitage (Trend Test)p⁺ Wilcoxon G-Test, p⁺⁺ Odds Ratio, OR Odds Ratio, AC Confidence Interval

* Significant result

Lavender et al. [40] reported that pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia treated with methotrexate (MTX), an antifolate that is transported into the cell by the RFC1 protein, homozygous or heterozygous for the allele A, have a greater propensity to adverse events than patients with the GG genotype. The same genotype also was associated with higher plasma concentrations of MTX compared with GA and GG genotypes, although this association is not linked to the disease progression.

Studying the role of folic acid supplementation in mothers who were in the gestational period, French et al. [10] reported a significant decline in the incidence of neuroblastoma in childhood after this supplementation (1:57 to 0.62 in 10,000 infants, $p < 0.0001$), which gives us evidence about the importance of folic acid in the development of this tumor. The folate metabolism is closely associated with fetal development [41], because during this event there is a high rate of cell division and

differentiation, and thus there is a greater need for folic acid for synthesis and DNA repair [42].

According to the results of this study, individuals with genotype A80A for the *SLC19A1* gene may have a poor absorption of folate by the cell, altering the metabolism of folate and compromising the process of cell division, causing genomic instability and oncogene activation and thus promoting the development of neuroblastoma. This effect is even greater during embryonic development, where the need for greater production of DNA is necessary to maintain high rates of cell division and differentiation.

Conclusion

The results of this study suggest an association of *SLC19A1* A80A polymorphism with the risk of developing neuroblastoma. Further studies are needed in other populations with larger sample size for a better understanding of the role of this polymorphism in the development of neuroblastoma.

Acknowledgments The authors thank the members of the Centro Oncohematológico Pediátrico do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco, Laboratório de Genética Molecular Humana da Universidade Federal de Pernambuco and the little patients who had participated in this study. Our acknowledgments to Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of interest The authors report no conflict of interest.

References

- Brodeur GM (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3:203–216
- Schraub M, Westermann F, Hatz II et al (2003) Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 4:472–480
- Lam WA, Cao L, Umesh V et al (2010) Extracellular matrix rigidity modulates neuroblastoma cell differentiation and N-myc expression. *Mol Cancer* 9:35
- Ganey RJ, Ross JA, Wall DA et al (1997) Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *J Pediatr Hematol Oncol* 19:428–432
- Brodeur GM, Maris JM (2002) Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds) Principles and practice of pediatric oncology, 4th edn. Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 865–937
- Harder T, Plogemann A, Harder A (2010) Birth weight and risk of neuroblastoma: a meta-analysis. *Int J Epidemiol* 39(7):746–756
- Bailey LB, Gregory JF (1989) Folate metabolism and requirements. *J Nutr* 119:779–782
- Suh JR, Harbig AK, Sower PJ (2001) New perspectives on folate metabolism. *Annu Rev Nutr* 21:255–282
- Dall R (1992) The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res* 52:2024–2029
- French AL, Grant R, Weitzman S et al (2003) Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clin Pharmacol Ther* 74(3):288–294
- Sharp L, Little J (2004) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a huge review. *Am J Epidemiol* 159:423–443
- Roscoe SG, Melkman C, Greenbridge C et al (2009) MTHFR 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms and the age of onset of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Eur J Human Genet* 17:629–635
- Sinachman N, Wongwanat S, Kijjanachulap S (2008) Folate pathway genetic polymorphisms and susceptibility of central nervous system tumors in Thai children. *Cancer Detect Prev* 32:72–78
- Lima ELS, Silva VC, Silva HDA et al (2010) MTR polymorphic variant A2756G and neuroblastoma risk in Brazilian children. *Pediatr Blood Cancer* 54:904–908
- Ulrich CM, Curtis K, Potter JD et al (2005) Polymorphisms in the reduced folate carrier, thymidylate synthase, or methionine synthase and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 14:2509–2516
- Chung A, Emery-Fillon N, Courcy GP et al (2000) A polymorphism (80G>>A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 70:310–315
- Van Der Put NMJ, Van Der Meulen EF, Kluifmans LA et al (1997) Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM* 90:511–517
- Frost P, Blom HJ, Miles R et al (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111–113
- Van Der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens EMJ et al (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62:1044–1051
- Kawakami K, Omura K, Kanohira E et al (1999) Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 19:3249–3252
- Blount BC, Mack MM, Wehr CM et al (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3280–3285
- Rhys CM, Beir VA (1996) Mammalian DNA repair responses and genomic instability. *ENR* 77:289–305
- Usmani BA (1993) Genomic instability and metastatic progression. *Pathobiol* 61:109–116
- Sambrook J, Russell DW (2001) Rapid isolation of yeast DNA. In: Hoffman CS (ed) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 631–632
- Nascimento EM, Spinelli MCS, Rodrigues CJ et al (2003) Protocolo de extração do DNA de material parafinado para análise de microsatélites em leiomiossarcomas. *J Bras Patol Med Lab* 39(3):253–255
- Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Haddad R et al (2008) The MTR A2756G polymorphism is associated with an increase of plasma homocysteine concentration in Brazilian individuals with down syndrome. *Braz J Med Biol Res* 41(1):34–40
- Hannon DL, Shields DC, Woodside JV et al (1999) Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol* 17:288–300
- Hidvei A, Matus K, Hamajima N et al (2003) Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and uracil

- hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Hematol* 88:159–166
29. Davis SS, Rogers MA, Fundergrass TW (1987) The incidence and epidemiologic characteristics of neuroblastoma in the US. *Am J Epidemiol* 125:1063–1074
 30. Grevas A, Fungtun A, Rauck A et al (1997) The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the US. *Cancer* 80:2321–2332
 31. Mathurly LH, Hou Z, Deng Y (2007) Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metast Rev* 26:111–128
 32. Whelan JR, Gifford AJ, Wit T et al (2001) Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier: characterization of a high-frequency G/A variant at position 80 and transport properties of the His [27] and Arg [27] carriers. *Clin Cancer Res* 7:3416–3422
 33. De Marco F, Calevo MG, Monosi A et al (2001) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs. *Eur J Pediatr Surg* 11:S14–S17
 34. Shaw GM, Lammert EJ, Zhu H et al (2002) Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (ABCG), and risk of spina bifida. *Am J Med Genet* 108:1–6
 35. Martin I, Devlin AM, Leclerc D et al (2003) Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. *Mol Genet Metab* 78:197–209
 36. Pei L, Zhu H, Ren A et al (2005) Reduced folate carrier gene is a risk factor for neural tube defects in a Chinese population, birth defects. *Res A Clin Mol Toxicol* 73:428–433
 37. Li L, Shi Y, Sun J et al (2011) Xenopus reduced folate carrier regulates neural crest development epigenetically. *PLoS ONE* 6:e27188
 38. Wang L, Chen W, Wang J et al (2006) Reduced folate carrier gene G80A polymorphism is associated with an increased risk of gastroesophageal cancers in a Chinese population. *Eur J Cancer* 42:3206–3211
 39. Skibola CF, Forrest MS, Coppola F et al (2004) Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 104:2155–2162
 40. Laverdiere C, Chénouf S, Cosset I et al (2002) Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100:3832–3834
 41. Antony AC (2007) In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am J Clin Nutr* 85:598S–603S
 42. Ashworth CJ, Antipatis C (2001) Micronutrient programming of development throughout gestation. *Reprod* 122:527–535

ANEXO 5

New cytogenetic aberrations found in a case of aggressive retinoblastoma

J.E.X.S. Barros^{1,2}, E.M. Soares-Ventura¹, N. Santos², B.A.S. Amaral^{1,2},
F.M. Oliveira¹, R.S. Vera Cruz¹, V.L.L. Morais¹, T.J. Marques-Salles^{1,2}
and M.T.C. Muniz^{1,3}

¹Centro de Oncohematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

³Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁴Departamento de Clínica Médica, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Corresponding author: J.E.X.S. Barros
E-mail: jemimaeline@gmail.com

Genet. Mol. Res. 11 (2): 1666-1670 (2012)

Received October 24, 2011

Accepted January 19, 2012

Published June 15, 2012

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2012.June.15.16>

ABSTRACT. We describe a case of retinoblastoma with an atypical presentation and previously unreported cytogenetic aberrations. A 19-month-old girl with left intraocular retinoblastoma was treated with enucleation and chemotherapy. The disease showed aggressive evolution within a short period between diagnosis and relapse. Eight months after diagnosis, a new large tumor was present in the orbit of the right eye, with diffuse bone pain, pancytopenia and diffuse infiltration into the bone marrow and the central nervous system. The child did not respond to treatment and died. Cytogenetic studies made with G-banding, FISH and SKY analysis showed chromosomal aberrations commonly associated with retinoblastoma, including del(13q), i(6p),

+1, and monosomy 16, along with others that had not been reported previously, including *dup(5q)*, *dic(15;22)* and *add(14q)*. The new chromosomal aberrations may be related to the aggressiveness of the disease in this case.

Key words: Retinoblastoma; Cytogenetics; *del(13q)*; *i(6p)*

INTRODUCTION

Retinoblastoma (Rb) is the most common intraocular malignancy in childhood, with an annual incidence of 1/15,000-20,000 live births (Aerts et al., 2006). It can be unifocal or multifocal, affecting one or both eyes at the same time, and it is termed sporadic or hereditary. It requires complex treatment, encompassing several therapeutic strategies in order to preserve life and eyesight (Ervenne et al., 2003).

Rb can infiltrate the brain via the optic nerve or the adjacent tissues, and thus, the disease can become extraocular (Chintagumpala et al., 2007). Metastatic disease with no evidence of optic nerve involvement is rare. Lumbar puncture with cerebrospinal fluid analysis and bone marrow aspiration are not routinely performed. However, these tests are indicated in children with advanced intraocular disease or with evidence of extraocular disease at presentation (Melamed et al., 2006). Rb can disseminate to other parts of the body including the bone marrow, although this rarely occurs, and it is generally scattered among normal elements (Khurshid et al., 2004). Some tumors such as neuroblastoma and medulloblastoma can fully infiltrate the bone marrow and thus simulate acute leukemia (Inoue et al., 1974). Nevertheless, when this pattern of disease occurs, it provides us the opportunity to examine directly the karyotype of the tumor cells. The specific cytogenetic abnormalities may also be of value in suggesting the diagnosis of the disease (Daly et al., 1987; Oliveros and Yimis, 1995).

The present study describes an atypical case of a child with left intraocular Rb at diagnosis who was treated with enucleation prior to chemotherapy. However, eight months after diagnosis, a large tumor was present in the right orbit, along with diffuse bone pain, pancytopenia and diffuse infiltration into bone marrow and into the CNS. Cytogenetic analysis of bone marrow cells showed chromosomal aberrations common to Rb, such as *del(13q)*, *i(6p)*, +1, and monosomy 16, besides others not yet described, including *dup(5q)*, *dic(15;22)* and *add(14q)*.

CASE REPORT

A 19-month-old girl was admitted to our institution with leukocoria in the left eye in December 2003. Retina mapping showed a vascularized, white-mass tumor with points of calcification, occupying more than half of the retina and making it difficult to see the optic nerve. There was vitreous hemorrhage associated with endophytic and exophytic growth. Cranial computed tomography and magnetic resonance imaging revealed a localized left eye tumor. A histopathological study revealed an Rb that had surrounded the head of the optic nerve, but not beyond the lamina cribosa (Group V, Reese-Ellsworth classification) (Linn, 2005). Laboratory tests, cerebrospinal fluid (CSF) and bone marrow showed no abnormalities.

The patient was treated with enucleation and chemotherapy in accordance with a Brazilian Retinoblastoma Protocol (Antonelli et al., 2003). The treatment was completed in May

2004, and she was followed up monthly. Four months after the end of the treatment, she was hospitalized with leg pain, lethargy, irritability, and a hardened tumor in the orbit of the right eye. A complete blood count revealed a low platelet count ($49,000/\text{mm}^3$), and biochemical tests showed high levels of LDH (1033 IU). Cerebral tomography showed an extensive extra axial mass surrounding the frontal region. Anatomopathological examination of the tumor in the right orbit revealed the presence of malignant small-cell neoplasia and immunohistochemical tests were positive for S100 protein, synaptophysin, NSF, and GFAP, and negative for CD99 and NB84. Bone marrow showed a massive malignant infiltration of small round cells, with scarce and basophilic cytoplasm and few visible nucleoli. Immunophenotypic tests of tumors cells were negative for leukemia markers. Cytogenetic analysis by the G-banding disclosed the following: 47,XX,+1,dup(5)(q11.2;q35),+i(6p),del(13)(q12;q14),add(14)(q32),dic(15;22)(p11.1;q13),-16,+mar[10]/47,XX,+1,dup(5)(q11.2;q35),+i(6p),del(13)(q12;q14),add(14)(q32),dic(15;22)(p11.1;q13)[5]/48,XX,+1,dup(5)(q11.2;q35),+i(6p),del(13)(q12;q14),add(14)(q32),dic(15;22)(p11.1;q13),+mar[1] (Figure 1A). Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using a 6p probe (QBiogene) showed three signals: two normal 6p and one i(6p) in the five metaphases analyzed (Figure 1B). SKY analysis confirmed the abnormalities previously seen by G-banding and identified the origin of the marker chromosome as chromosome 1 (Figure 1C). The definitive karyotype found was 48,XX,+1,+1dup(5)(q11.2;q35),+i(6p),del(13)(q12;q14),add(14)(q32),dic(15;22)(p11.1;q13),-16. RT-PCR analysis did not detect t(4;11), t(1;19), t(9;22), t(12;21), t(11;22) or amplifications of the *MTCN* gene in tumor cells or bone marrow.

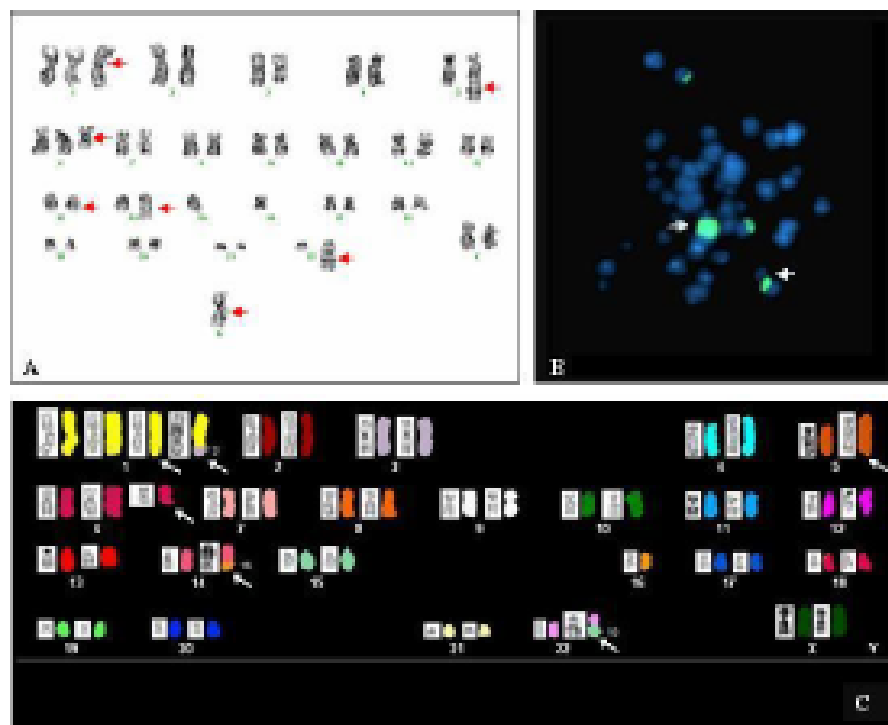


Figure 1. G-banding, FISH and SKY analysis of the patient. A. G-banded karyotype: 47,XX,+1,dup(5)(q11.2;q35),+i(6)(p10),del(13)(q12;q14),add(14)(q32),dic(15;22)(p11.1;q13),-16,+mar[10]. B. FISH using 6p probe. Arrow indicates i(6p). C. SKY karyotype showing the inverted DAPI (left) and the classified (right) profiles for each chromosome. Extra copies of chromosome 1, where one of them has insertion of part of chromosome 3, ins(1;3)(q21;q26q29),dup(3)(q11.2;q35),+i(6)(p10),del(13)(q12;q14),t(14;16)(q32;q11.1),dic(15;22)(p11.1;q13), were indicated by arrows.

The child was treated for relapse with ifosfamide, carboplatin and etoposide. In February 2005, the child presented seizures and malignant cells infiltrating the spinal fluid. A new treatment was tried with carboplatin, vincristine and intrathecal chemotherapy, followed by cranial and neuraxial radiotherapy. In May 2005, the patient no longer responded to chemotherapy and died of progressive disease.

DISCUSSION

Since 1993, 125 Rb cases have been registered in our institution, but only one with bone marrow totally infiltrated by immature cells. Three similar cases have already been described in the literature and the diagnoses were based on histopathological and cytogenetic studies (Inoue et al., 1974; Daly et al., 1987; Khurshid et al., 2004). The main cytogenetic alterations described in Rb are del(13), gain 1q and 6p, loss of 5q, and monosomy 16. Because few cases of Rb diffusely infiltrating in the bone marrow had been described, it is very difficult to know which cytogenetic alterations are involved and its relation to aggressiveness of disease.

The deletion of 13q is the alteration directly responsible for Rb, where the tumor suppressor gene *RB1* is located, also i(6p) is important since it is the most common abnormality found in 50 to 60% of Rb cases. The presence of i(6p) may be an important genetic change in the development and progression of the tumor (Paderova et al., 2007). Other regions such as 1q36 (*E2F2* and *ID3*), 2p24-25 (*ID2* and *MYCN*), 9p (p16), and 16p22 (*E2F4*) are also involved in the pRb pathway. Perhaps these regions contribute towards a third event that is necessary for completing the malignant transformation (Mairal et al., 2000; Chen et al., 2001). The new cytogenetic abnormalities described in this case were duplication 5q, add(14q) and dic(15;22). It is possible that these changes played a role in the dissemination and progression of disease.

The atypical bilateral Rb case described here had an aggressive evolution with short period between diagnosis and relapse. The tumor cells did not respond to chemotherapy and the child died shortly afterwards. Certainly, the cytogenetic studies helped to diagnose the disease, but other cases of disseminated Rb need to be studied to clarify when cytogenetic abnormalities are present and to know whether they are present at the beginning of the disease, as well as determining their importance in the evolution of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Banco do Brasil Foundation through Criança e Vida Project, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- Aerts I, Lambroso-Le RL, Gauthier-Villars M, Brisse H, et al. (2006). Retinoblastoma. *Orphanet J. Rare Dis.* 1: 31.
- Antonelli CBG, Steinhorst F, Ribeiro KCB and Erwenne CM (2003). Evolução da terapêutica do retinoblastoma. *Arq. Bras. Oftalmol.* 66: 401-408.
- Chen D, Gallie BL and Squire JA (2001). Minimal regions of chromosomal imbalance in retinoblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 129: 57-63.
- Chintagumpala M, Chavez-Barrios P, Payse EA, Flon SE, et al. (2007). Retinoblastoma: review of current management. *Oncologist* 12: 1237-1246.
- Daly HA, Davison EV, Pearson AD, Reid MM, et al. (1987). Chromosomes of metastatic retinoblastoma. *Arch. Dis. Child*

- 62: 410-411.
- Erwenne CM, Antonelli CBG, Marback EF and Novaes PE (2003). Tratamento conservador em retinoblastoma intra-ocular. *Arq. Bras. Oftalmol.* 66: 791-795.
- Inoue S, Ravindranath Y, Ottenbreit MJ, Thompson RI, et al. (1974). Chromosomal analysis of metastatic retinoblastoma cells. *Humangenetik* 25: 111-118.
- Khurshid I, Naeem S, Bashir F and Lone A (2004). Retinoblastoma; Bone marrow infiltration - A study of 30 cases. *Ann. King Edward Med. Coll.* 10: 194-196.
- Linn MA (2005). Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification. *Ophthalmol. Clin. North Am.* 18: 41-53, viii.
- Mairal A, Pinglier E, Gilbert E, Peter M, et al. (2000). Detection of chromosome imbalances in retinoblastoma by parallel karyotype and CGH analyses. *Genes Chromosomes Cancer* 28: 370-379.
- Melanud A, Palekar R and Singh A (2006). Retinoblastoma. *Am. Fam. Physician* 73: 1039-1044.
- Oliveros O and Yunis E (1995). Chromosome evolution in retinoblastoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 82: 155-160.
- Paderova J, Orlic-Milacic M, Yoshimoto M, da Cunha SG, et al. (2007). Novel 6p rearrangements and recurrent translocation breakpoints in retinoblastoma cell lines identified by spectral karyotyping and mBAND analyses. *Cancer Genet. Cytogenet.* 179: 102-111.