

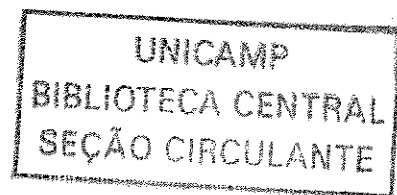
SIMONE DOS SANTOS AGUIAR

***VALOR PROGNÓSTICO DOS MARCADORES DE
IMUNO-HISTOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
NOS PACIENTES COM HEPATOBLASTOMA NA
INFÂNCIA***

200407857

CAMPINAS

2003



SIMONE DOS SANTOS AGUIAR

***VALOR PROGNÓSTICO DOS MARCADORES DE
IMUNO-HISTOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
NOS PACIENTES COM HEPATOBLASTOMA NA
INFÂNCIA***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Saúde da Criança e do Adolescente, área de Pediatria.*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise.

CAMPINAS

2003

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Ag 93v
V	EX
TOMBO BCI	580 94
PROC.	16P/117/04
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/5/04
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM0019B040-6

BIB ID 316879

Ag93v Aguiar, Simone dos Santos
 Valor prognóstico dos marcadores de imuno-histoquímica e biologia molecular nos pacientes com hepatoblastoma na infância. / Simone dos Santos Aguiar. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

 Orientador : Silvia Regina Brandalise
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Histologia. 2. Fígado. 3. Proliferação celular. I. Silvia Regina Brandalise. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Tese de MESTRADO

Orientador:

Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise

Membros:

1. Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro

2. Profa. Dra. Paula Bruniera

3. Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 2003

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Martha e Celso, por
seu amor incondicional por todos os dias
da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise, Professora Assistente do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP, Diretora do Centro Infantil Boldrini, minha grande amiga, querida mestra, grande exemplo, pelo carinho com que me acompanha pelos caminhos da Oncohematologia Pediátrica, nem sempre fáceis, mas sempre firmes, com alegria e determinação em fazer o melhor pelos nossos *pequenos*.

À Profa. Dra. Izilda Aparecida Cardinalli, Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Infantil Boldrini, Professora Titular do Departamento de Anatomia Patológica da FCM/USF, por sua capacidade profissional e disponibilidade nos estudos de Imuno-histoquímica desta tese.

Ao Prof. Dr. Marcio H. Malogolowkin, *Associate Professor of Pediatrics, Deputy Division Head, Clinical Affairs, Director of the Bone and Soft Tissue Tumor Program, Children's Hospital Los Angeles (CHLA/USC/Califórnia/EUA)*, pela revisão deste estudo .

À bióloga Cecília Copi, do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Infantil Boldrini, pela Técnica de Imuno-histoquímica.

À bióloga Lilian de Jesus G. Zambaldi, do Serviço de Biologia Molecular e Citogenética do Centro Infantil Boldrini, pela Técnica de Híbridização *in situ*.

À Sra. Maria Alessandra Silva Salgado, Gerente de Dados do Centro Infantil Boldrini.

Às Sras. Vera Silvia S. Froes Ficoni e Maria Marcia Laurêncio Munholi, Bibliotecárias do Centro Infantil Boldrini.

À Profa. Ana Sabbag, pela revisão da língua portuguesa deste estudo.

Ao Engenheiro Tomaz Puga Leivas, Sra. Lúcia Maria Evangelista Ferraz e Sra. Márcia Salgado da Costa Amaral, pela análise estatística e formatação desta tese.

Aos Profs. Drs. Cecília Escanhoela, Professora Assistente do Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP e Marcelo Alvarenga, Professor Assistente do Departamento de Anatomia Patológica da PUCC / IPC / CAISM UNICAMP, pelo empréstimo de parte do material utilizado neste trabalho.

Aos Colegas Oncohematologistas do Centro Infantil Boldrini, que cuidaram dos meus pacientes durante a realização deste trabalho, meu obrigada.

Dr. Amílcar Cardoso de Azevedo.

Dra. Ana Cláudia Mendonça dos Anjos Caram.

Dra. Andrea Maria Capellano.

Dr. Eduardo Ioshiteru Matsuda.

Dr. Emerson Gatti .

Dra. Marcela Bottasso Nogueira Dias da Silva.

Dr. Marcelo Rizzatti.

Profª. Dra. Maria José Mastellaro.

Dra. Maria Teresa Grande.

Dra. Marilene de Fátima Ribeiro .

Dra. Mônica Pinheiro de Almeida Veríssimo.

Dra. Paula Serrano Ferreira.

Dr. Sátiro Nakamura de Oliveira.

Profª. Dra. Silvia Regina Brandalise.

Dra. Valéria Pereira Paiva.

Dra. Vitória Régia Pereira Pinheiro.

Aos Prof. Dr. Antônio Gonçalves de Oliveira Filho, Chefe do Serviço de Cirurgia Pediátrica do Centro Infantil Boldrini e Professor Assistente do Departamento de Cirurgia Pediátrica / UNICAMP, e Prof. Dr. Marcio Lopes Miranda, Professor Assistente do Serviço de Cirurgia Pediátrica do Centro Infantil Boldrini e do Departamento de Cirurgia Pediátrica / UNICAMP, por sua capacidade profissional causadora de grande impacto na cura de nossos pacientes.

Ao Dr. Hélio Gomes, por ter indicado os caminhos da Pediatria quando eu ainda era estudante de Medicina .

Aos Professores do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo , grandes responsáveis por minha formação Pediátrica:

Prof. Dr. Carlos Alberto Longui.

Profª. Dra. Clery Bernardi Gallacci.

Profª. Dra. Elisabeth Teixeira Mendes Livramento Prado.

Prof. Dr. Fernando Norio Arita.

Profª. Dra. Heloísa Cattini Perrone.

Prof. Dr. Julio Toporovski.

Profª. Dra. Maria Lúcia Bastos Passarelli.

Profª. Dra. Maria Tereza Gutierrez.

Profª. Dra. Nancy Therezinha B. Cordovani.

Profª. Dra. Neiva Damaceno.

Prof. Dr. Sergio Rosenberg.

Profª. Dra. Silvana Brasília Sacchetti.

Profª. Dra. Valderez Fonseca Raposo de Mello.

Profª. Dra. Vanda Benini.

Profª. Dra. Wanda Alves de Bastos.

E, em especial à Profª. Dra. Paula Bruniera , Chefe do Departamento de Oncohematologia Pediátrica da Santa Casa de São Paulo e à Profª. Dra. Maria Pizza, Professora Assistente do Departamento de Oncohematologia Pediátrica da Santa Casa de São Paulo, pelo incentivo na escolha desta especialidade, meu muito obrigada.

“Se nós pudéssemos, como num passe de mágica, definirmos as responsabilidades, o desempenho profissional com Amor e Respeito, as aquisições técnicas tão importantes para a busca dos Conhecimentos verdadeiros, a vida talvez fosse mais fácil. Por outro lado, talvez fosse mais difícil pois, quem deteria a verdade a ser alcançada?”

Silvia Regina Brandalise.

	<i>Pág</i>
RESUMO.....	<i>xix</i>
ABSTRACT.....	<i>xxiii</i>
1 - INTRODUÇÃO.....	27
1.1 - Classificação dos hepatoblastomas.....	33
1.2 - Imuno-histoquímica.....	40
2 - OBJETIVOS.....	53
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4 - RESULTADOS.....	67
5 - DISCUSSÃO.....	111
6 - CONCLUSÕES.....	133
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
8 - ANEXOS.....	149

RESUMO

VALOR PROGNÓSTICO DOS MARCADORES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR NOS PACIENTES COM HEPATOBLASTOMA NA INFÂNCIA.

Introdução. O hepatoblastoma é um tumor embrionário raro (1:1.000.000 nascimentos) , representando o tumor hepático mais freqüente em crianças com idade menor que 3 anos. A importância da histopatologia e o prognóstico do hepatoblastoma é conhecida na literatura , sendo o tipo histológico fetal puro o de melhor prognóstico. Com o desenvolvimento da imuno-histoquímica (IH) e da biologia molecular , nova compreensão dos hepatoblastomas pode ser delineada através de expressões protéicas específicas , cuja relação com o subtipo histopatológico precisa ainda ser elucidada. **Objetivos** . Este trabalho procurou verificar a associação entre os achados histopatológicos e os marcadores de IH ao diagnóstico e no momento cirúrgico , após o uso de quimioterapia (QT) , com a sobrevida global e livre de eventos , dos pacientes portadores de hepatoblastoma na infância. **Material e Métodos.** Foram analisados os espécimes do tumor hepático de 21 pacientes , com revisão do diagnóstico histológico por pelo menos dois patologistas experientes. Para a pesquisa da expressão do PCNA , do Ki-67 , do p53 , da β -Catenina , do c-erb-B2 e da glicoproteína P , foi utilizada a técnica de IH . As determinações destas expressões protéicas foram realizadas ao diagnóstico , e no momento cirúrgico , após o 4º ciclo de QT. A análise da expressão do p53 também foi realizada pela técnica de *FISH* em 8 pacientes . Quatorze pacientes eram do sexo feminino e 7 do masculino , com idade média ao diagnóstico de 13 meses. **Resultados.** A expressão do PCNA foi positiva em 100% dos casos avaliados ao diagnóstico , sendo negativo em apenas um paciente no momento cirúrgico. Nos tumores do tipo histológico fetal/embrionário o valor da positividade do PCNA variou de 27% a 52,2% ao diagnóstico , e de 8,2% a 90% no momento cirúrgico . Nos tumores do tipo fetal puro , esta variação foi de 20% a 75,2% ao diagnóstico e , no momento cirúrgico de 4,8% a 29,4%. A β -Catenina apresentou expressão positiva em 59% dos casos ao diagnóstico e 87% no momento cirúrgico. Ao diagnóstico, a expressão do Ki-67 variou de 7% a 43,6% , tornando-se negativo no momento cirúrgico em 84% dos casos . Em 15 pacientes, a positividade do Ki-67 ao diagnóstico estava associada com sobrevida livre de eventos em 12 anos de 66,7% ($p=0,01$). A expressão do p53 por IH foi avaliada em 17 casos , sendo negativa em 16 deles. A expressão gênica do p53 pela técnica de *FISH* foi avaliada em 8

casos , sendo positiva em 5 . Apenas 1 caso apresentou resultados positivos para o p53 nas duas técnicas empregadas . Ao diagnóstico a GpP foi positiva em 2 casos. A expressão negativa da GpP em 10 pacientes, no momento cirúrgico, está associada à sobrevida global em 12 anos de 70% ($p=0,67$). Os pacientes com expressão positiva do **c-erb-B2** ao diagnóstico tiveram sobrevida global de 87,5% em 8 anos , enquanto aqueles com expressão negativa deste marcador obtiveram sobrevida global de 33,3% ($p=0,02$).

Conclusões. A expressão positiva do **c-erb-B2** , ao diagnóstico , teve valor prognóstico , determinando taxas de sobrevida em 8 anos de 87,5 ($p=0,02$). A expressão positiva do **Ki-67** ao diagnóstico , também se associou com melhor prognóstico , determinando taxas de sobrevida global em 12 anos de 66,7% ($p=0,01$). A expressão dos demais marcadores não se correlacionou com o prognóstico destes pacientes. O subtipo histológico fetal puro teve importância prognóstica , sendo variável independente de risco ($p=0,02$).

Palavras chave : Histologia, fígado e proliferação celular.

ABSTRACT

PROGNOSTIC VALUE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR BIOLOGY MARKERS IN CHILDHOOD HEPATOBLASTOMA PATIENTS.

Background. Hepatoblastoma is a rare embryonal tumor (1:1.000.000/ new births) , being the most frequent liver tumor in children under the age of 3 years . The pathology prognostic value is well determined in the literature . Tumors with fetal type have the best prognosis. With the advances of immunohistochemical (IH) and biology markers , a new comprehension about this tumor still need to be known. **Objectives.** The present study investigated the relationship between the pathology results and IH findings , at the moment of diagnosis and surgery after the 4th cycle of chemotherapy (CHEMO) with the overall survival rates (OS) and event free survival (EFS) of pediatric hepatoblastoma patients (pts). **Patients and Methods.** Twenty one pediatric hepatoblastoma's specimens had the histological subtype reviewed at least for 2 experienced pathologists . To evaluate the protein expression for PCNA , Ki-67 , p53 , β -Catenin, c-erb-B2 and Glycoprotein P (GpP) IH techniques were performed at the moment of diagnosis and after CHEMO (surgery time). The p53 analysis was also done by FISH in 8 pts. Fourteen pts were female and 7 male , with the median age at diagnosis of 13 months . **Results .** One hundred per cent of the pts had overexpression of PCNA at the moment of diagnosis , being negative in just one pt at surgery time .Considering tumors with histological fetal/embryonal type , the PCNA labeling index ranged from 27% to 52.2% at diagnosis , and from 8.2% to 90% at surgery .In those cases with the fetal type , this positivity was from 20% to 75.2% at diagnosis , and from 4.8% to 29.4% at surgery . Overexpression of β -Catenin at the moment of diagnosis was detected in 59% of the pts and in 87% of them at surgical time . Ki-67 ranged from 7% to 43.6 % and remained negative after CHEMO , in 10 pts (84%) . The overexpression of Ki-67 at the moment of diagnosis determined an event free survival (EFS) of 66.7% in 12 years (p= 0.01). One out 21 pts (4.7%) presented p53 overexpression by IH , confirmed by FISH . Controversially, among 57.1% of pts with negative p53 by IH , the overexpression by FISH analysis was defined as positive. Considering GpP positivity at diagnosis , it was detected in 2 pts , being negative after CHEMO in 10 pts. Pts with overexpression of GpP at surgery time had an OS rate of 80% versus 70% for the pts with this negative expression (p=0.67) .So the overexpression of GpP was not a worse prognosis predict factor . Finally the overexpression of c-erb-B2 at diagnosis was related with an OS

of 87.5% at 8 years , while for those pts with negative expression the OS rate was 33.3% (p=0.02). **Conclusion.** The overexpression of c-erb-B2 at diagnosis is related to better survival rates in those pts with hepatoblastoma (p=0.02). The overexpression of Ki-67 at diagnosis is a good prognostic factor by determining an OS rate of 66.7% in 12 years (p=0.01).The overexpression of remaining markers did not correlate with the OS neither EFS rates .According to histology , pts with fetal type had better prognosis (p=0.02).

Key words : Histology, liver and cell proliferation.

1 - INTRODUÇÃO

O hepatoblastoma é um tumor embrionário raro (1:1.000.000 nascimentos), representando o tumor hepático mais freqüente em crianças com idade menor que 3 anos (BUENDIA, 2002). A maioria dos casos de hepatoblastoma é esporádica. É discreto o predomínio em meninos, com relação masculino: feminino de 1,4 a 2 : 1 (PIZZO; POPLACK, 2002).

De acordo com o *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER), programa de Registro de Câncer de Base Populacional dos Estados Unidos da América, o hepatoblastoma é um dos mais raros tumores sólidos da infância, alcançando não mais do que 1,1% de todas as neoplasias malignas pediátricas. A incidência anual nos E.U.A. é de 1,5 casos por milhão de crianças com idade inferior a 15 anos, e sua maior prevalência está entre 6 meses e 3 anos de idade (PIZZO; POPLACK, 2002).

Os primeiros relatos descrevendo a possível correlação entre prematuridade e hepatoblastoma são de RILEY e FREYER, apresentados no simpósio da Sociedade Americana de Oncohematologia Pediátrica em 1996 (FEUSNER; PLASCHKES, 2002). Entre 13 casos de hepatoblastoma apresentados, 6 pacientes nasceram com idade gestacional menor do que 38 semanas. Quase simultaneamente acontece a publicação conjunta do grupo americano CCG (*Children's Cancer Group*) (*Proceedings* da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO), 1997) e do registro de tumores do JCCG (*Japan Children's Cancer Group*) (FREUSNER et al. 1996). Análises epidemiológicas do Registro de Câncer de Base Populacional do Japão sugerem associação entre a ocorrência de hepatoblastoma e o antecedente de prematuridade da criança. Nesse país, o hepatoblastoma correspondeu a 58% de todas as neoplasias que ocorreram nos bebês prematuros sobreviventes que apresentavam, ao nascimento, peso inferior a 1 quilograma. A publicação de 303 diagnósticos de hepatoblastoma em crianças residentes no Japão no período de 1985 a 1995 revelou que 15 deles ocorreram em prematuros que tinham ao nascimento peso inferior a 1,5 quilogramas.

O risco relativo, para os recém-nascidos com peso inferior a 1 quilograma ao nascimento, de apresentar hepatoblastoma foi de 15,64, comparado a 2,53 para aqueles com peso entre 1 quilograma e 1,499 quilogramas, e de 2,21 para os recém-nascidos pesando entre 2 e 2,499 quilogramas (TANIMURA et al. 1998). Estes dados levam à necessidade

de se estudar fatores relativos à prematuridade que contribuam para a tumorigênese hepática, assim como à necessidade do acompanhamento clínico no primeiro ano de vida destes recém-nascidos.

No estudo do *Children's Cancer Group* para hepatoblastoma, (CCG 8881) realizado entre agosto de 1989 e novembro de 1992, 19% dos doentes registrados eram prematuros, com idade gestacional de nascimento inferior a 37 semanas, sendo que 10 deles tinham peso inferior a 1 quilograma ao nascer. A causa para esta associação é desconhecida. Algumas variáveis têm sido sugeridas como fatores de risco, tais como, a estação do ano ao nascimento, exposição a oxigenoterapia, uso de diuréticos, tornando necessária uma futura e sistemática análise epidemiológica dos casos de hepatoblastoma em crianças e adolescentes (FEUSNER; PLASCHKES, 2002).

Apesar dos tumores hepáticos não fazerem parte da Síndrome de Li-Fraumeni, e da mutação do gene p53 não ser o maior fator contribuinte para o desencadeamento do hepatoblastoma esporádico, CHEN et al. (1995) encontraram apenas 1 caso com super-expressão do p53 dentre 10 casos relatados de hepatoblastoma. Cifras mais expressivas foram mencionadas por RUCK et al. (1994), que demonstraram a reatividade do p53 em 4 dentre 12 pacientes (33,3%). Destes casos positivos, 2 apresentavam a histologia de pequenas células indiferenciadas e os outros 2, histologia do tipo fetal/embrionário, com positividade do p53 apenas na área embrionária. No Brasil, ZERBINI et al. (1998) encontraram a expressão do p53 em 9 casos de uma série com 21 hepatoblastomas (42,8%). O significado desta expressão necessita de futuros estudos correlacionando a imuno-histoquímica com as alterações no gene p53. Mutações somáticas foram detectadas em 10 casos de hepatoblastoma, em 5-8 exons do gene p53 por ODA et al. (1989), sugerindo a ocorrência de mutações ambientais envolvendo alguns casos de hepatoblastoma.

Quarenta a 60% dos casos de hepatoblastoma são considerados irresssecáveis ao diagnóstico. Dez a 20% dos doentes têm metástase pulmonar ao diagnóstico. A quimioterapia pré-operatória fez com que 85% destes tumores se tornassem ressecáveis. Somente nos casos totalmente ressecados, houve aumento da sobrevida. EHRLICH et al. (1997) demonstraram, em uma série de 22 casos de hepatoblastoma, que a resposta destes

pacientes à quimioterapia entre o 3º e o 6º ciclos de tratamento é de 91%. A quimioterapia pré-operatória aumentou a ressecabilidade destes tumores de 40-60% para 90% dos casos. Ao diagnóstico, a α -feto proteína está aumentada em 90% dos pacientes com hepatoblastoma, retornando aos níveis normais após a completa ressecção do tumor.

VAN TORNOUT et al. (1997) demonstraram que, para os tumores irressecáveis ou metastáticos, o nível da α -feto proteína é fator preditivo para identificar a resposta ao tratamento. Estudando pacientes que foram submetidos a quimioterapia e cirurgia, aqueles que tiveram queda dos níveis de α -feto proteína em pelo menos 2 logaritmos tiveram pior prognóstico, enquanto aqueles que obtiveram queda mais abrupta, tiveram melhor prognóstico.

Nos últimos 20 anos, melhorou significativamente o prognóstico dos pacientes pediátricos portadores de hepatoblastoma. O sucesso terapêutico foi alcançado com a combinação de cirurgia e quimioterapia, através de estudos cooperativos e multicêntricos internacionais, dentre eles, o da Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (SIOP) (**FUCHS et al. 2002**).

Possivelmente em decorrência da raridade do diagnóstico do hepatoblastoma, a classificação histológica deste tumor desenvolveu-se vagarosamente nos últimos 50 anos. A classificação alicerçada nos componentes epiteliais do tumor dividiu os hepatoblastomas em tipo fetal puro , embrionário, macrotrabecular e aquele de pequenas células indiferenciadas (**ROWLAND, 2002**). Alguns autores também reconhecem mais duas categorias histopatológicas distintas, referentes aos tumores epiteliais mistos e os mesenquimatosos (**STOCKER, 1994**).

Grande contribuição no refinamento do diagnóstico histopatológico dos hepatoblastomas, foi a publicação de **ISHAK; GLUNZ em 1967**. Estes autores conservaram as categorias epiteliais e mistas já definidas na histologia dos hepatoblastomas, e descreveram em detalhe as células epiteliais, como um tipo de célula denominada do tipo fetal, facilmente reconhecida como célula com parênquima hepático que lembrava a célula hepática do fígado pré-natal. Estas células são arranjadas de forma irregular variando de tamanho, são menores que as células do parênquima hepático normal,

com relação núcleo-citoplasmática variando de 1:2 a 1:4, quando comparadas às células hepáticas não neoplásicas, que possuem relação núcleo /citoplasma de 1:4 a 1:6. Na célula do hepatoblastoma, os núcleos são redondos ou ovais, com poucas figuras de mitose. As células do tipo embrionário foram descritas como menos diferenciadas que as fetais, com pobre coesividade, usualmente agrupadas de forma laminar ou em feixes, às vezes formando pseudo-rosetas ou formações papilares. As células do tipo embrionário são alongadas, pequenas e escuras, pobremente definidas e irregulares. A atividade mitótica é mais freqüentemente observada, em comparação com a do tipo fetal.

A importância da histopatologia e o prognóstico do hepatoblastoma em crianças foram evidenciados por KASAI; WATANABE em 1970. Baseando-se na classificação de ISHAK; GLUNZ (1967), esses autores introduziram o conceito de hepatoblastoma de *tipo* epitelial fetal e do *tipo* embrionário, mostrando significativa correlação entre o tipo histológico epitelial fetal com um melhor prognóstico para os doentes.

Conclusões semelhantes foram obtidas por GONZALEZ-CRUSSI et al. em 1982. Segundo estes autores, em todos os casos de tumores hepáticos, a presença do componente fetal é mandatória, ao menos focalmente, para que estes sejam denominados de hepatoblastoma. Foi, então, proposta uma subclassificação baseada no componente fetal presente em pelo menos 2/3 da área do tumor.

Bem mais raros nos hepatoblastomas, são os subtipos histopatológicos de padrão macrotrabecular, e o de pequenas células indiferenciadas, primeiramente denominado de hepatoblastoma anaplásico. Este foi descrito como tumor de células pequenas, imaturas, com citoplasma escasso, lembrando as células do neuroblastoma (KASAI; WATANABE, 1970). Estas células imaturas podem ser estreladas ou ovaladas, com pouca eosinofilia, similares às células do hepatócito normal. Nestes casos as mitoses não são comuns.

Os hepatoblastomas são constituídos por hepatócitos fetais, hepatócitos embrionários ou de pequenas células anaplásicas (indiferenciadas), mostrando, às vezes, um componente macrotrabecular. Hepatoblastomas mistos (epiteliais/mesenquimatosos) contêm mesênquima primitivo e são derivados dos componentes miofibroblásticos, tecidos condróides e osteóides. Os hepatoblastomas teratóides são mistos de componentes epiteliais e mesenquimatosos.

A concepção atual é a de que o hepatoblastoma é um tumor embrionário, que contém parênquima hepático epitelial e/ou o componente mesenquimatoso (tipo epitelial e epitelial-mesenquimatoso). Com base neste componente epitelial aceitam-se quatro subtipos histopatológicos, adotados inclusive pelo Grupo Cooperativo Internacional (SIOPEL) que trata de hepatoblastoma de criança. O SIOPEL é um protocolo oficial da SIOP.

1.1- CLASSIFICAÇÃO DOS HEPATOBLASTOMAS

Hepatoblastoma de Morfologia Epitelial

Este tumor compreende os três subtipos abaixo especificados:

Tipo fetal

O tumor hepático é constituído por células menores que o hepatócito, com relação núcleo-citoplasmática diminuída, pouco pleomorfismo nuclear e nucléolo pequeno. Estas células fetais podem formar cordões, que contêm canálculos e sinusóides bem definidos. As células tumorais do tipo fetal podem conter citoplasma abundante com depósito de lipídeo, glicogênio e eosinofilia granular. Quando a totalidade do tumor é composta por este tipo de célula epitelial, tem sido proposto o termo hepatoblastoma com histologia fetal pura. Em alguns casos, pode haver presença de vasos sanguíneos. A presença dos ductos biliares não é característica dos hepatoblastomas de histologia fetal. As mitoses são infreqüentes (Figura 1).

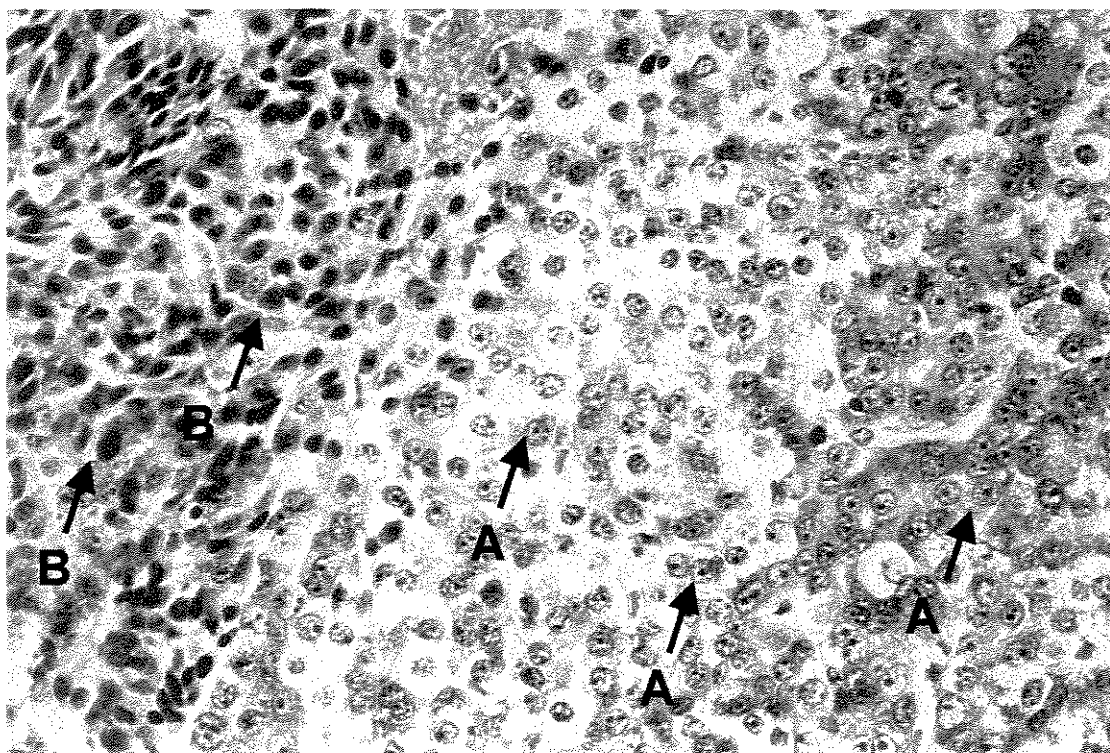


FIGURA 1- Hepatoblastoma epitelial fetal e embrionário. A) A direita, os hepatoblastos fetais, células de médio tamanho e núcleo claro e nucléolos evidentes, mostram agrupamentos de células claras e escuras. B) A esquerda, os hepatoblastos embrionários são constituídos por células menores, de citoplasma escasso, núcleo hipercromático e nucléolos não evidentes (H&E, 250 X)

Tipo embrionário

As células tumorais têm relação núcleo-citoplasmática maior, citoplasma basofílico esperso, em contraste com aquele eosinofílico do hepatoblastoma do tipo fetal. O núcleo tem cromatina grosseira e o nucléolo é proeminente. Mitoses são freqüentes. As células embrionárias apresentam-se de forma laminar ou em cordões e, algumas vezes, perdem a adesividade entre si, alterando a arquitetura da morfologia epitelial. Podem formar túbulos ou pseudo-rosetas, lembrando os ductos hepáticos primitivos observados a partir da sexta semana de gestação .

Tipo Macrotrabecular

Apresenta a repetitiva organização das células tumorais, do tipo fetais e/ou embrionárias, dispostas em cordões ou em placas. O tamanho das células tumorais pode exceder aquele da célula hepática normal, podendo lembrar as células malignas do hepatocarcinoma (Figura 2).

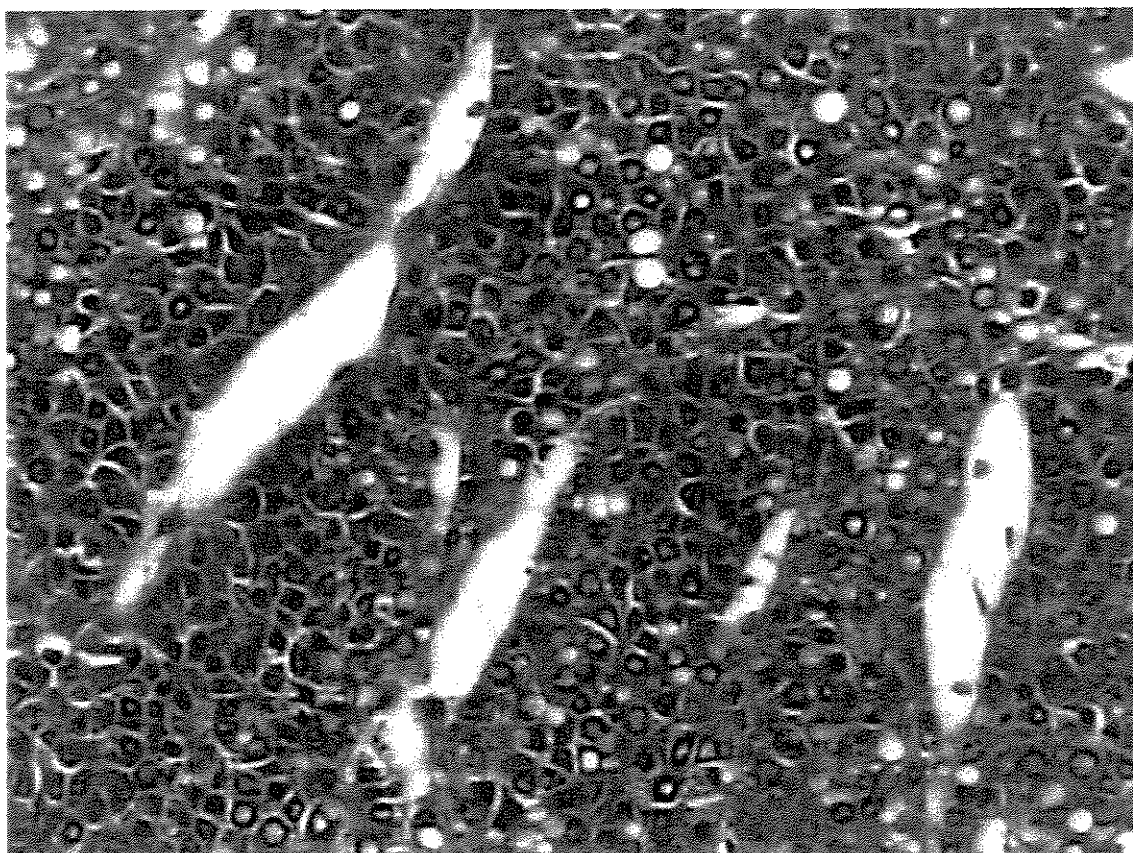


FIGURA 2- Hepatoblastoma macrotrabecular. As células neoplásicas distribuem-se em padrão trabecular formando cordões contendo cerca de 4 a 7 colunas de células tumorais bem diferenciadas (H&E, 400 X)

Tipo de pequenas células indiferenciadas

Antes chamado de hepatoblastoma anaplásico, este tipo de hepatoblastoma apresenta forma laminar, com perda da coesão entre as células. Mostra citoplasma escasso e alto índice de mitose. As células tumorais são tipicamente redondas ou ovaladas, mas em algumas áreas podem ser fusiformes (Figura 3).

Hepatoblastoma de Morfologia Mista

Abrange dois subtipos:

Tipo Misto, sem característica teratóide

Tumores hepáticos caracterizados pela presença de células do tipo epitelial fetal e/ou embrionária, associadas a componentes mesenquimatosos imaturos como, por exemplo, tecido do tipo osteóide.

Tipo Misto, com característica teratóide

O tumor contém, além dos componentes epitelial e mesenquimatosos imaturos, várias combinações de tecidos maduros como cartilagem, músculo esquelético, epitélio do tipo intestinal, epitélio escamoso e células produtoras de melanina (Figura 4).

Hepatoblastoma Não Classificável

A esta categoria pertencem os raros tumores hepáticos que não se encaixam em nenhum dos subtipos acima descritos.



FIGURA 3- Hepatoblastoma do tipo indiferenciado de pequenas células. A) O tumor é constituído por agrupamentos de células redondas, primitivas, de citoplasma escasso e núcleo hipercromático. B) Há moderada quantidade de substância mucóide de permeio (H&E, 100X)

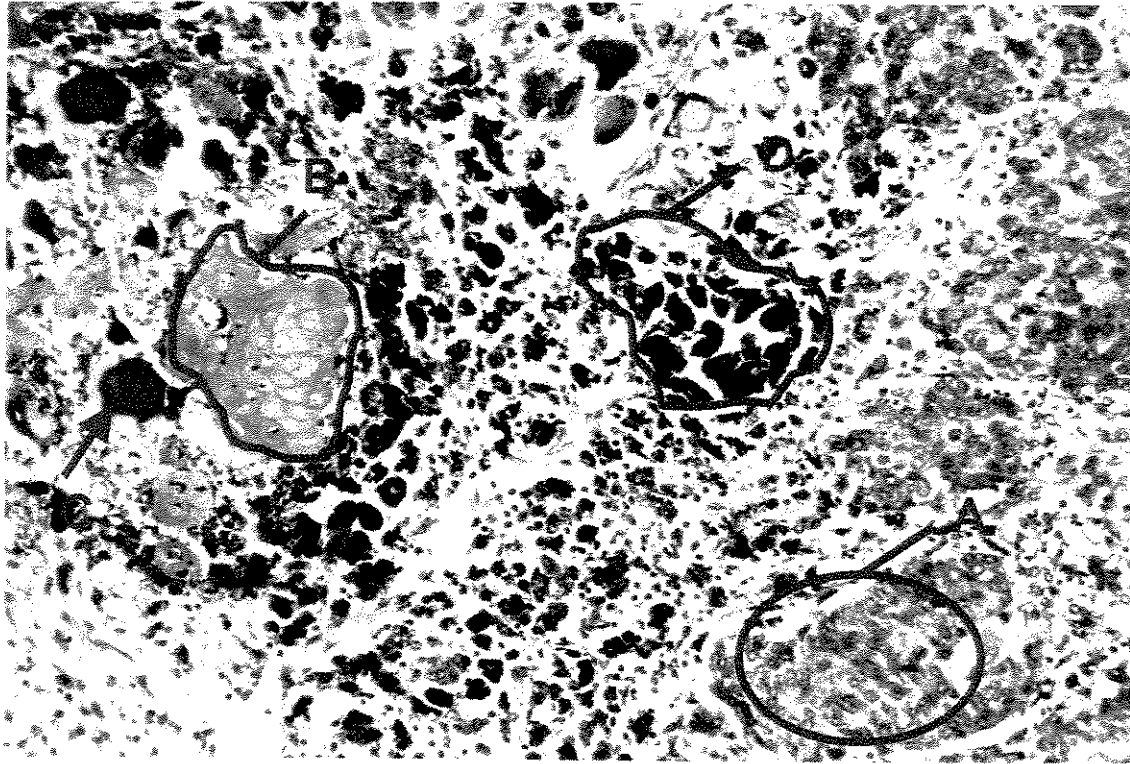


FIGURA 4- Hepatoblastoma misto: epitelial e mesenquimatoso. A) À direita, o tumor mostra agrupamentos de hepatoblastos fetais; B) A esquerda, identifica-se formação de matriz osteóide; C) pérola córnea; e D) no centro, presença de células tumorais contendo melanina (H&E, 250 X)

1.2- IMUNO-HISTOQUÍMICA

Com o desenvolvimento da imuno-histoquímica e da biologia molecular, uma nova compreensão dos hepatoblastomas pode ser delineada através de expressões protéicas específicas, cuja relação com o subtipo histopatológico precisa ainda ser elucidada. Entre as proteínas estudadas, mencionamos a β -Catenina, o p53, o PCNA, o Ki-67, a GpP e o c-erb-B2. O completo entendimento da interação destas expressões protéicas com esta doença auxiliará não só na delineação das diferentes estratégias de tratamento, como também na delineação futura das terapias dirigidas.

β - Catenina

A β - Catenina é uma proteína multifuncional, tendo papel importante tanto na adesão, quanto na diferenciação intercelular (BUENDIA, 2002). No tecido hepático normal, está localizada predominantemente na membrana das células, aparecendo como membrana linear uniforme marcando os hepatócitos, além de evidenciar intensamente a membrana e o citoplasma dos ductos biliares (INAGAWA et al. 2002). Por meio de análises imuno-histoquímica foi demonstrado aumento da proteína β -Catenina no núcleo e citoplasma das células do hepatoblastoma (Figura 5). A sua localização na membrana celular foi demonstrada no tumor hepático do tipo fetal puro, estando associada à expressão da E-caderina (WEI et al. 2000). Nas células tumorais do hepatoblastoma de origem epitelial, a β -Catenina é fortemente expressada tanto no núcleo como no citoplasma das mesmas, mostrando-se negativa nos fibroblastos e células endoteliais.

Na maioria dos casos de hepatoblastoma de componente fetal estudados por WEI et al. (2000), foi evidenciada uniforme positividade da β -Catenina no citoplasma celular e no núcleo das células dos hepatoblastomas do tipo de pequenas células (anaplásicos), e também naqueles de células embrionárias e de componentes macrotrabeculares.

A super expressão da β -Catenina presente em vários componentes celulares tumorais, incluindo células do tipo dos hepatócitos, em diferentes estágios de maturação, como também nas células de tecido escamoso, osteóide e condróide, além das células derivadas do mesênquima, sugere o importante papel desta proteína na patogênese dos hepatoblastomas.

Antígeno de Proliferação Celular (PCNA)

O antígeno de Proliferação Celular (PCNA) é uma proteína nuclear que se expressa em todas as fases de proliferação do ciclo celular normal, apresentando níveis baixos em G0 e G1, com pico máximo na fase S, quando se liga aos sítios de replicação do DNA, mantendo-se em níveis elevados durante a proliferação celular (KISS et al. 1998). É facilmente detectado por técnicas de imuno-histoquímica.

RUGGE et al. (1998) demonstraram em estudo com 34 doentes portadores de hepatoblastoma que, nos casos onde havia baixa proliferação celular (hepatoblastoma do tipo fetal puro), a proteína PCNA (Figura 6) teve baixa expressão. Significante associação foi também demonstrada no subtipo histológico embrionário do hepatoblastoma entre o conteúdo de DNA (aneuploidia), a porcentagem de células na fase S do ciclo celular e os níveis de PCNA.

Este estudo, realizado com pequeno número de doentes, necessita confirmação em séries maiores, com o objetivo da sua inserção na rotina dos protocolos cooperativos prospectivos que estudam este tumor hepático.

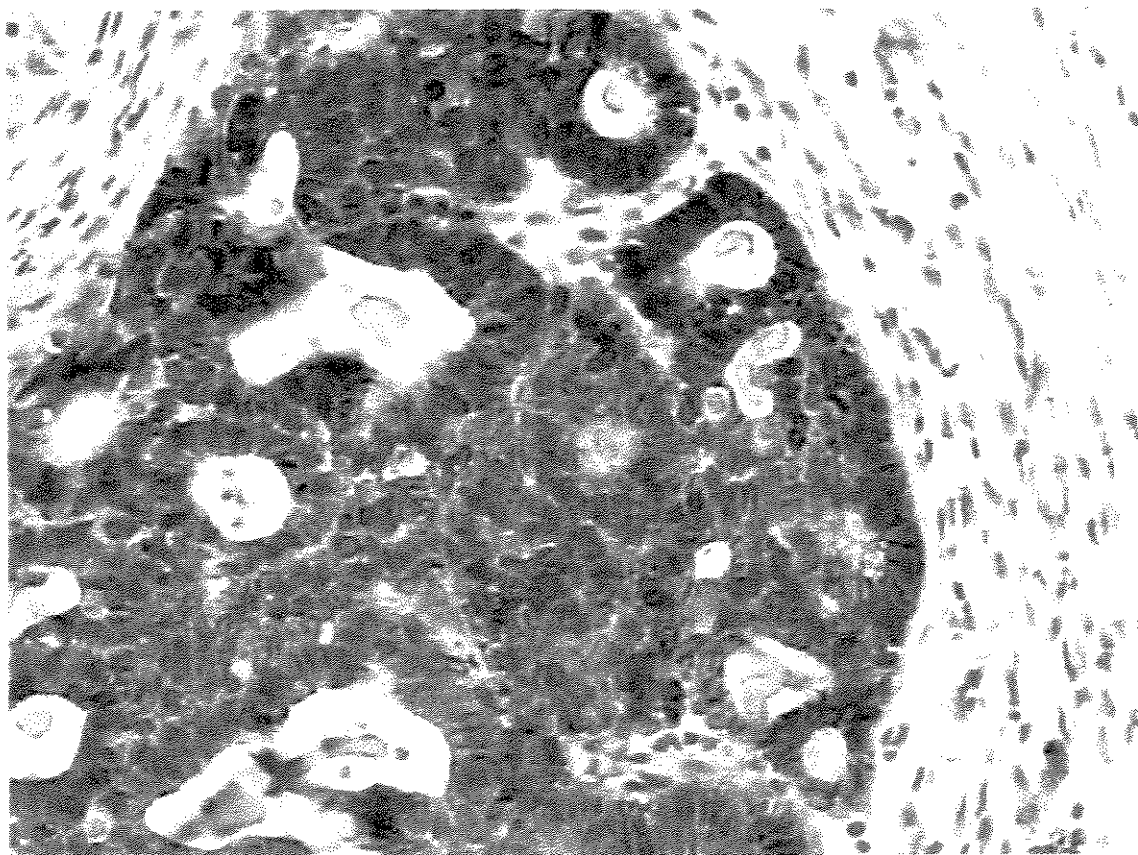


FIGURA 5- Expressão da beta-catenina em hepatoblastos embrionários (200 X).

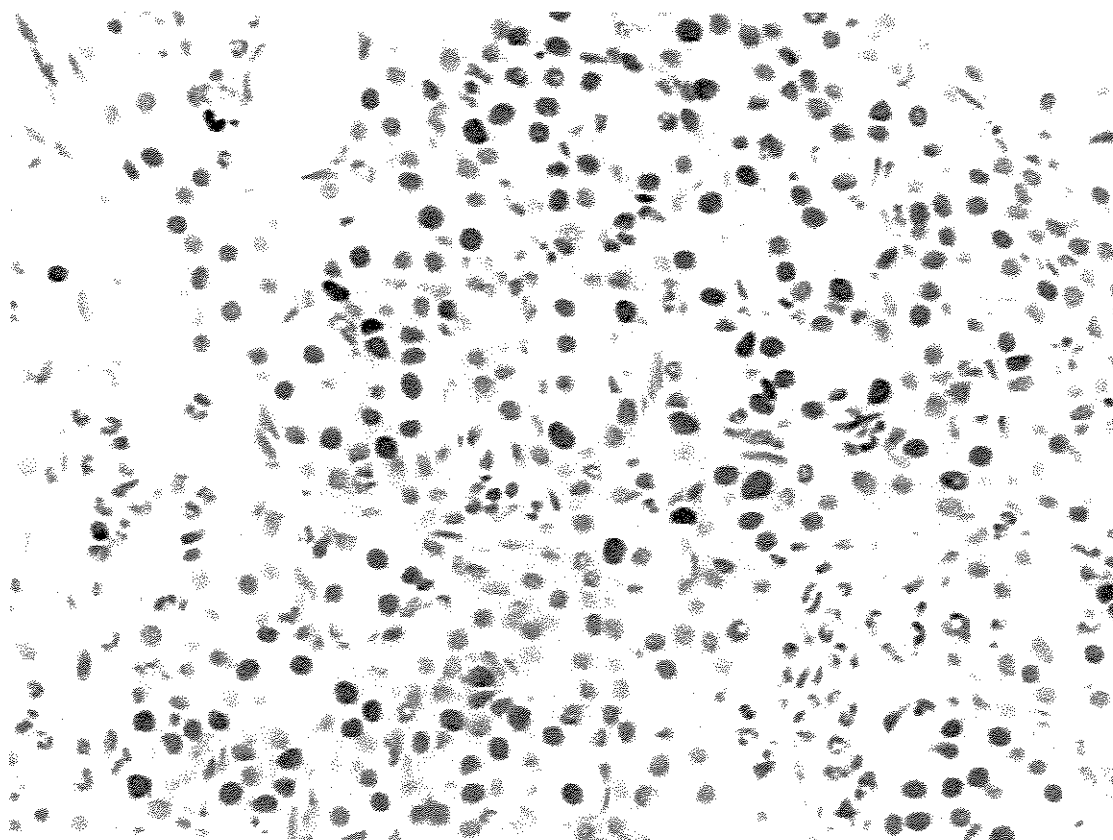


FIGURA 6- Expressão do PCNA nas células tumorais (400 X)

Antígeno Ki-67

O Ki-67 (MIB-1) é um antígeno protéico nuclear, presente em todo o ciclo de proliferação celular (G1, S, G2, M), e ausente na fase de quiescência celular (G0). É codificado por um gene localizado no cromossomo 10q25, com peso molecular entre 345 e 395 kD (ARA et al. 1997).

Pode ser identificado por imuno-histoquímica (Figura 7). A expressão deste antígeno está associada ao grau de proliferação celular fazendo, portanto, com que se possa determinar a porcentagem de células em fase de crescimento, e, conseqüentemente, seu potencial de metastatização.

ARA et al. (1997), em análise de 18 pacientes portadores de hepatoblastoma, estudando a expressão do Ki-67 neste tumor, demonstraram que, nos casos que se apresentavam com estadio clínico baixo (estádios I e II), os índices de proliferação celular eram, como esperado, menores do que os observados nos casos onde o estadio clínico era mais avançado (estádios III e IV). Estes mesmos achados foram observados após o uso dos agentes quimioterápicos, evidenciando, também, a alta porcentagem de proliferação celular nos estádios III e IV, associando-se ao pior prognóstico destes pacientes. Os autores sugeriram que o Ki-67 pudesse ser utilizado como fator prognóstico da resposta terapêutica à quimioterapia, empregada antes do momento cirúrgico.

Esta foi a primeira vez que se mostrou a importância da determinação de um marcador de proliferação celular na avaliação da resposta à quimioterapia (ARA et al. 1997), em estudo realizado em hepatoblastomas. A limitação do reduzido número de casos não permitiu, entretanto, a inclusão rotineira do Ki-67 na definição da resposta terapêutica do hepatoblastoma à quimioterapia.

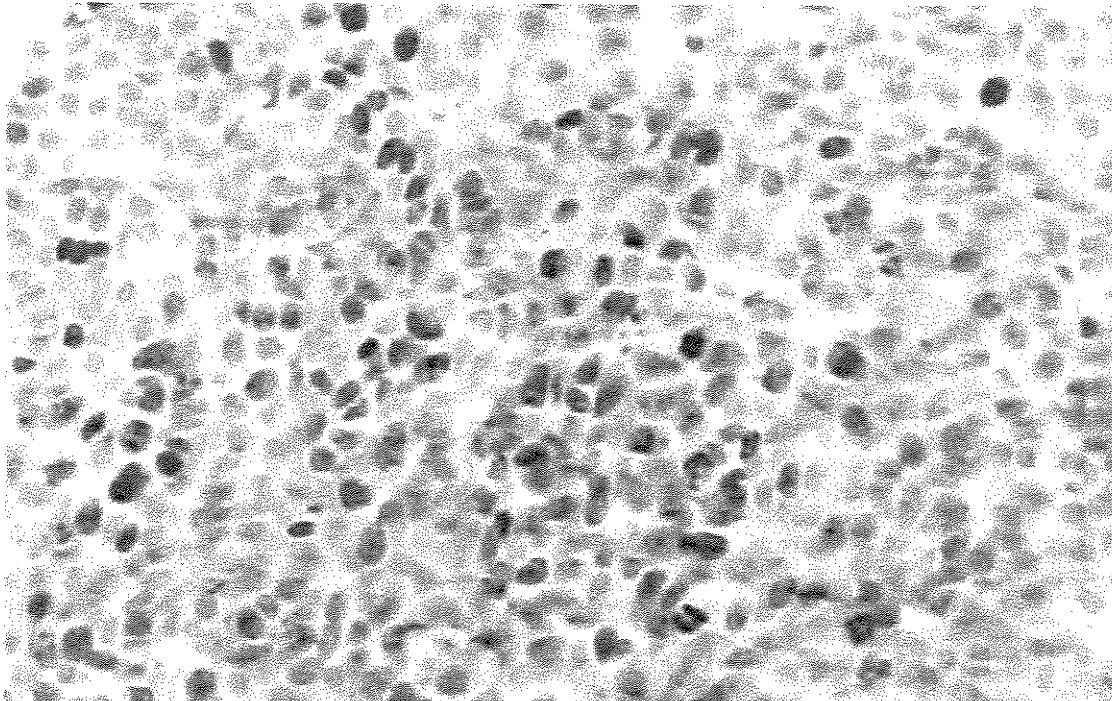


FIGURA 7- Expressão do Ki-67 no núcleo de células tumorais (200 X)

Proteína p53

Os tumores malignos, ditos esporádicos, surgem em decorrência de uma série de alterações celulares somáticas, causadas por deleções cromossômicas, rearranjos ou mutações.

O oncogene é uma versão modificada do proto-oncogene normal, com importante papel na função celular, como crescimento e diferenciação. Um número limitado de genes, chamados de genes supressores, dentre eles o p53, localizado no cromossomo 17p, tem papel em diversas neoplasias. Sua influência na gênese do hepatoblastoma ainda não está provada (SETH; PAPAS, 1993).

O gene p53 é um gene de supressão tumoral; várias mutações podem convertê-lo em um gene dominante (ZERBINI et al. 1998). A proteína p53 é uma proteína reguladora da proliferação celular que pode ser detectada por imuno-histoquímica (Figura 8).

Um estudo da expressão da proteína p53 em hepatoblastomas foi realizado por RUCK et al. (1994), em 12 doentes. Os autores demonstraram a ausência de positividade do p53 nos casos de hepatoblastoma do tipo fetal puro e do tipo mesenquimatoso. A expressão do p53 foi positiva nos casos de hepatoblastoma do tipo histológico de pequenas células. Esta ausência de imuno-reatividade observada na maioria dos hepatoblastomas talvez possa traduzir a mutação do gene p53 e, possivelmente, sua positividade, indicar pior prognóstico (RUCK et al. 1994). Num certo paralelo, este fato foi demonstrado em outros tipos de tumores em adultos, como o carcinoma de mama e de cólon, onde a positividade do p53 tem prognóstico desfavorável (HEINZE et al. 1999).

Na presente data, a perda ou mutação da proteína p53 nos hepatoblastomas de crianças ainda não está definitivamente estabelecida com relação ao prognóstico e possibilidade de metastatização.

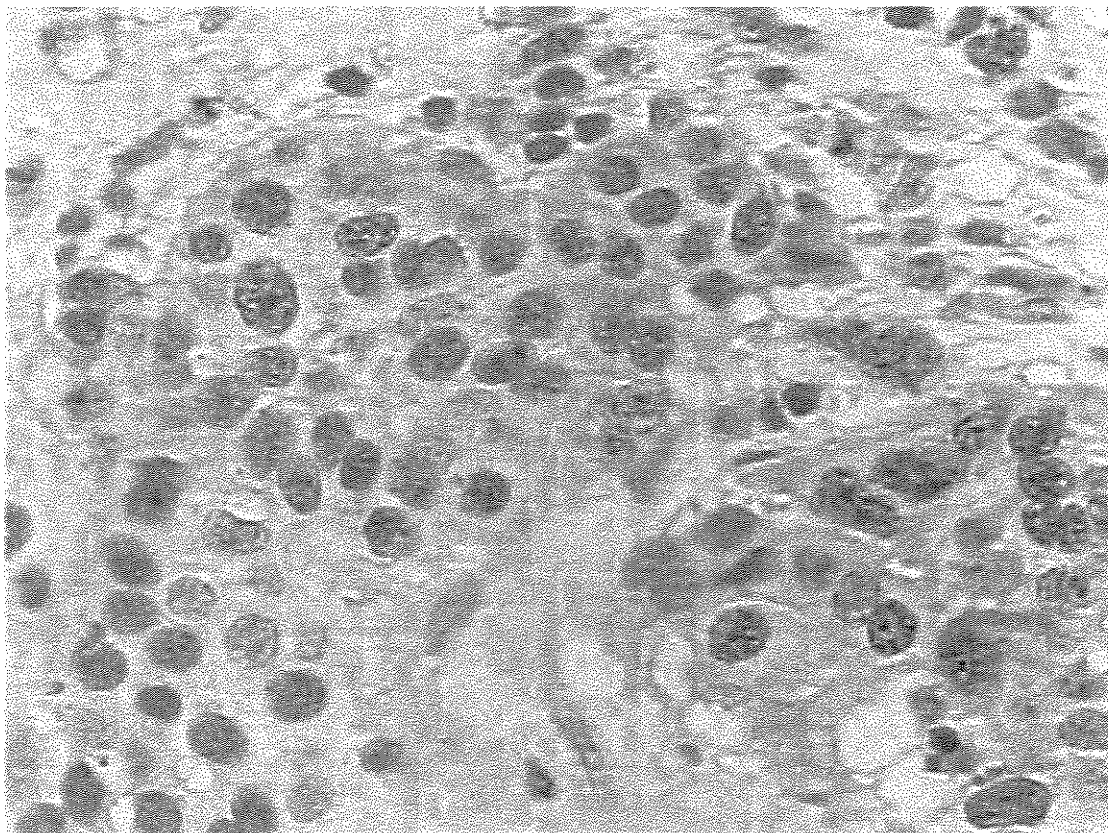


FIGURA 8- Expressão do p53 no núcleo de hepatoblastos fetais (250 X)

c-erb-B2

O gene *c-erb-B2* tem a função de codificar receptores na membrana celular e promover o crescimento da célula. É um proto-oncogene localizado no cromossomo 17q21. Por métodos de imuno-histoquímica (Figura 9), é possível detectar a proteína do gene *c-erb-B2* na membrana celular (HEINZE et al. 1999).

Não existem relatos na literatura sobre a expressão do *c-erb-B2* em hepatoblastomas. VLASOFF et al. (2002) estudaram a expressão do *c-erb-B2* em 27 casos de hepatocarcinoma em adultos. Não observaram superexpressão ou amplificação desta proteína. Resultados distintos foram registrados por HEINZE et al. (1999), que mostraram a expressão do *c-erb-B2* associada à mutação do gene *p53*, em amostra de 34 doentes com hepatocarcinoma em estádios avançados, sugerindo que sua expressividade pudesse ter valor prognóstico em adultos. A expressão do *c-erb-B2* nos tumores de mama e de estômago tem sido descrita como fator de mau prognóstico (ANDERSEN et al. 1995).

Considerando a importância desta proteína em variedade de tumores em adultos, estudos ainda são necessários para se conhecer o papel do *c-erb-B2* na patogênese do hepatoblastoma da faixa etária pediátrica.

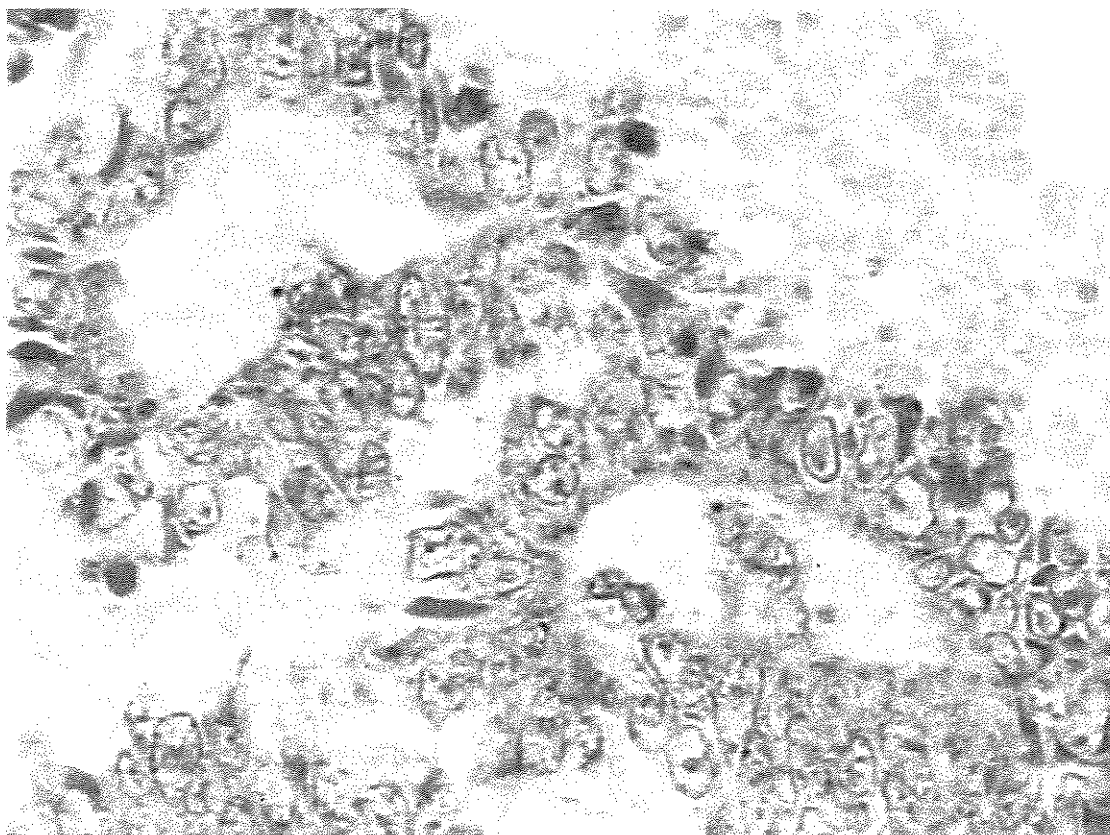


FIGURA 9- Expressão do c-erb-B2 no citoplasma de hepatoblastos embrionários
(400 X)

Glicoproteína P

O desenvolvimento de resistência aos agentes quimioterápicos é um dos maiores obstáculos à cura dos pacientes com câncer. O fenômeno conhecido como MDR, traduzindo a resistência celular a diversos quimioterápicos não relacionados, é o resultado da expressão funcional de uma bomba de efluxo na membrana citoplasmática, denominada glicoproteína P (GpP) (BECK (1990); HARRIS; HOCHAUSER (1992); LIST (1995)). A expressão elevada da GpP, é produto do gene *mdr-1*, localizado no cromossomo 7.

A presença de altos níveis da GpP em tecidos normais de rins e de adrenais tem sido demonstrada por métodos de *Northen e Western Blotting* (MURPHY et al., 1990). Técnicas de imuno-histoquímica (Figura 10) evidenciaram que a presença da GpP pode ser localizada na superfície das células tubulares dos rins, no cólon, nas vias biliares e ainda nas células endoteliais dos capilares do cérebro (JETTE et al., 1996).

Muitos investigadores mensuraram os níveis de GpP nos tumores em seres humanos, antes e após a terapia com drogas anti-neoplásicas, sendo encontrados níveis elevados em tumores de mama e de ovário (TWENTYMAN et al., 1987); KASHANI-SABET et al. 1990). Quanto aos tumores hepáticos, WARMANN et al., (2002) estudaram a possível associação entre a expressão do gene *mdr-1* e a ocorrência de resistência a múltiplas drogas.

A determinação dos mecanismos de resistência a múltiplas drogas (MDR) é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (BECK, 1990; HARRIS; HOCHAUSER, 1992; LIST, 1995). Ao diagnóstico, ou no decorrer da terapia, a expressividade deste gene poderia sugerir pior prognóstico e, eventualmente, permitir modificações na abordagem terapêutica para estes pacientes, na ausência de resposta favorável ou mesmo antes da ocorrência da recidiva. Na pediatria este conhecimento torna-se relevante, considerando-se a baixa idade do acometimento dessas crianças pelo hepatoblastoma. Intervenções realizadas antes da recidiva possivelmente aumentariam as chances de cura.

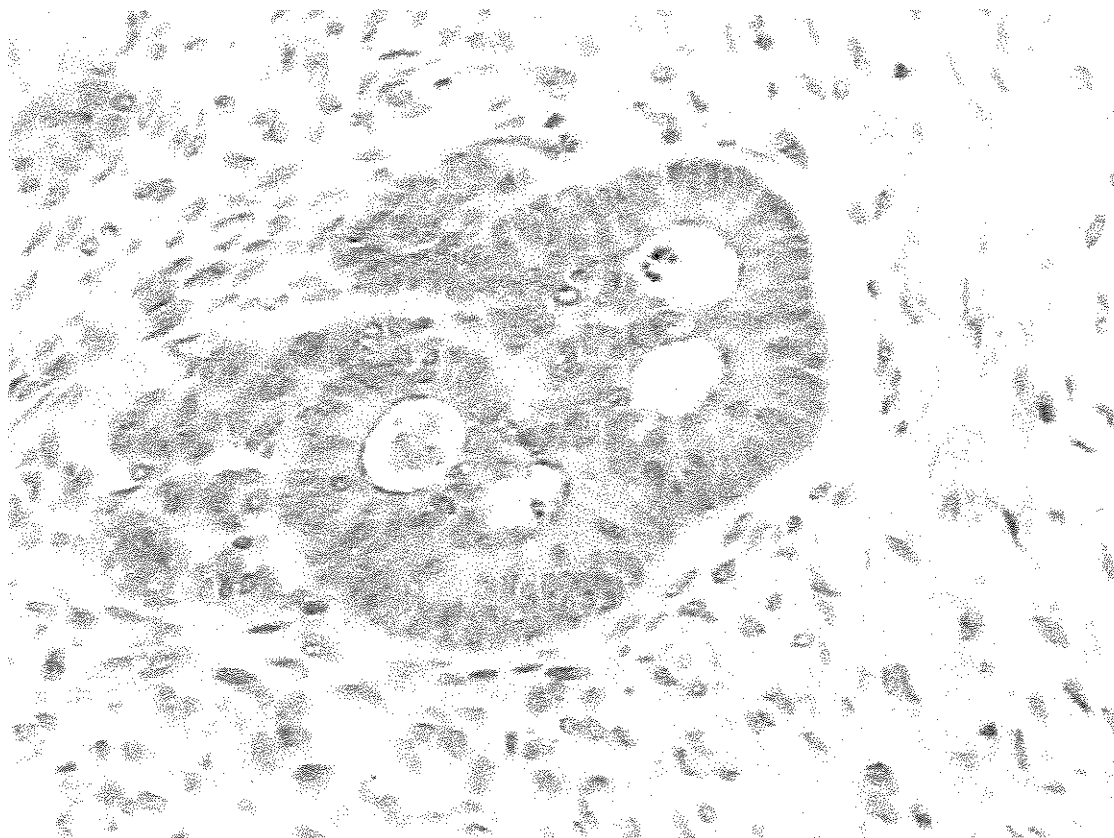


FIGURA 10- Expressão da GpP na membrana citoplasmática de hepatoblastos embrionários (400 X)

2 - OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Verificar a associação entre os achados histopatológicos e a expressão dos marcadores β -Catenina , PCNA, Ki-67, p53 , c-erb-B2 e Glicoproteína P ao diagnóstico e no momento cirúrgico , nos pacientes com hepatoblastoma na infância.
2. Avaliar a positividade da expressão da β -Catenina , do PCNA, do Ki-67, do p53 , do c-erb-B2 e da Glicoproteína P, determinados ao diagnóstico e após o quarto ciclo do tratamento quimioterápico com a evolução clínica do paciente.
3. Determinar a sobrevida livre de eventos dos doentes pediátricos portadores de hepatoblastoma diagnosticados e tratados no Centro Infantil Boldrini , Campinas/SP , Brasil.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo baseou-se em análises de imuno-histoquímica de material de biópsia/peça cirúrgica de hepatoblastomas arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Centro Infantil Dr. Domingos A. Boldrini, Campinas/SP, no período de 1984 a 2001.

Foram analisados os prontuários dos pacientes portadores de hepatoblastoma diagnosticados e tratados no Centro Infantil Boldrini, no mesmo período. Dos 25 pacientes registrados, 21 foram considerados analisáveis.

Foram excluídos os pacientes dos quais não foi possível resgatar em serviços externos de anatomia patológica o material de biópsia diagnóstica e/ou cirurgia para análise imuno-histoquímica, e aqueles cujos pais não deram o consentimento livre esclarecido para inclusão do material no estudo (ANEXO I), e o caso nº 6, por perda de seguimento após a realização de transplante hepático em outro Serviço, na análise de sobrevida.

Em virtude do longo período de abrangência deste estudo, para uniformizar a análise dos casos, todos os tumores foram re-estadiados de acordo com os critérios adotados pela Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (SIOP) e seu grupo de estudo para tratamento de hepatoblastoma (SIOPEL/PRETEXT). Este estadiamento leva em consideração as estruturas anatômica e funcional do fígado. Os lados direito e esquerdo deste órgão são separados e denominados de fígado direito e esquerdo. Cada parte do fígado é dividida em dois setores (Figura 11) denominados de:

- setor lateral esquerdo e setor medial esquerdo.
- setor anterior medial direito e setor posterior lateral direito.

O setor lateral esquerdo abrange os segmentos hepáticos 2 e 3. O setor medial esquerdo contém os segmentos 4 e a metade do segmento 1. O setor anterior medial direito inclui os segmentos 5 e 8. O setor posterior lateral direito envolve segmentos 6 e 7 e mais a metade do segmento 1. A representação esquemática desses segmentos consta na Figura 12.

Este sistema de setores, conhecido como PRETEXT, tem como objetivo determinar ao diagnóstico, a localização intra-hepática do tumor, assim como sua extensão extra-hepática. É um método puramente descritivo, registrado antes da ressecção cirúrgica.

De acordo com o **número de setores livres e/ou envolvidos**, os tumores são agrupados em quatro grupos (Figura 13):

- Grupo I -** presença de tumor em um dos setores, sendo os três adjacentes livres de tumor.
- Grupo II -** presença de tumor em dois dos setores, sendo os dois adjacentes livres de tumor.
- Grupo III -** presença de tumor em três setores, podendo haver apenas um setor livre ou dois não adjacentes.
- Grupo IV -** os quatro setores estão envolvidos pelo tumor.

Quanto ao **acometimento extra-hepático**, a extensão do tumor é classificada , de acordo com o órgão envolvido:

- V -** indica extensão do tumor para a veia cava e/ou para as três veias hepáticas .
- P -** indica extensão do tumor para dentro da veia porta principal ou veia porta direita e esquerda.
- E -** indica presença de extensão extra-hepática (massa fora do fígado e fora da veia).
- M -** indica presença de metástase a distância (por ex. pulmão).

A estratégia terapêutica adotada neste grupo de 21 pacientes, baseada no estadió clínico inicial, foi determinada segundo os protocolos CCG 881/POG 8103, SIOPEL 1, SIOPEL 2 e SIOPEL 3, descritos sumariamente no ANEXO II.

Objetivando a uniformização dos diagnósticos histopatológicos em quase vinte anos de estudo, foi realizada a Revisão Central das lâminas por quatro patologistas experientes, sendo um deles o Prof. Dr. Arthur Zimmermann (Professor de Patologia da Universidade de Bern, Suíça, membro do Grupo Cooperativo para tratamento de Hepatoblastoma da SIOP/SIOPEL), a Profa. Dra. Cecília Escanhoela (Professora do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP), a Profa. Dra. Izilda Aparecida Cardinalli (Chefe do Serviço de Anatomia

Patológica do Centro Infantil Boldrini / Professora Titular do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da USF), e o Prof. Dr. Marcelo Alvarenga (Professor do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da PUCC/ Instituto de Patologia de Campinas e do CAISM/ UNICAMP).

Em alguns casos não foi possível resgatar nos outros serviços externos de anatomia patológica o material da biópsia (4/21 pacientes) e/ou da cirurgia (8/21).

Para a realização dos estudos de imuno-histoquímica houve a necessidade da desparafinização dos blocos. O processamento das lâminas, conforme descrição abaixo, segue o padronizado pela técnica modificada de HSU et al., 1981 .

Metodologia Para a Realização da Imuno-histoquímica :

Processo de retirada da parafina, com re-hidratação do material, em 3 trocas de xilol (P.A.), com 3 minutos em cada troca. Depois, passagem do material em álcool absoluto, álcool 95%, álcool 80% e álcool 70% por 3 minutos cada e, após isto, lavagem em cuba com água destilada, por 3 vezes. O material está pronto para receber o anticorpo.

Bloqueio da peroxidase endógena: 3 trocas de 7 minutos cada, em água oxigenada 3% (diluição 1:10). Lavar por mais 5 vezes em água destilada.

Recuperação antigênica: preparar lâmina de tampão citrato, pH 6,0. Colocar na panela a vapor por 30 minutos a 95°C, e deixar esfriar por 15 minutos.

Preparo da solução com o anticorpo primário: diluir cada anticorpo primário em BSA (soro albumina bovina), de acordo com as indicações do fabricante (Laboratório Novo Castra, Newcastle, UK). As especificidades das diluições foram as seguintes:

- a) β -catenina (NCL-B-CAT, clone 17 C2), na diluição 1:100;
- b) p53 (NCL-p53-DO7, clone DO7), na diluição 1:50;
- c) PCNA (NCL-PCNA, clone PC10), na diluição 1:150;

- d) Ki-67 (NCL-Ki67-MM1, clone MM1), na diluição 1:100;
- e) JSB1 ((GpP) NCL-JSB1, clone JSB1), na diluição 1:20;
- f) c-erb-B2 (NCL-C-erb B -2p), na diluição 1:300.

Secar cada lâmina com papel filtro e circundar o corte com caneta para a realização da imuno-histoquímica. Pingar algumas gotas dos anticorpos primários específicos, de modo que todo o corte seja coberto. Incubar em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. A seguir, colocar em geladeira, por aproximadamente 12 horas.

Para a lavagem, retirar o excesso do anticorpo primário de cada lâmina, e colocar em cuba com BS (Tampão Fosfato Salina), totalizando 3 lavagens de 7 minutos cada, à temperatura ambiente.

Adição do Anticorpo Secundário (biotinilado, DAKO LSAB + System, HRP). Secar cada lâmina com papel filtro e pingar o anticorpo de ligação biotinilado, incubar por 30 minutos a 37°C, retirar o excesso de anticorpo de cada lâmina e colocar em cuba com PBS, 3 lavagens de 7 minutos cada, à temperatura ambiente.

Adição do Conjugado Streptavidina Peroxidase (sistema LSAB + HRP, ou Kit DAKO). Secar cada lâmina com papel filtro e pingar o conjugado, incubando por 30 minutos a 37°C.

Coloração: retirar o excesso do Conjugado e colocar as lâminas em cuba com PBS. Preparar o cromógeno DAB (3,3' diaminobenzidina SIGMA) da seguinte maneira: 60mg de DAB + 100ml de PBS + 500µl de H₂O₂ (30%).

Dissolver o DAB em PBS, acrescentar H₂O₂ (30%), misturando bem. Colocar as lâminas para corar à temperatura ambiente, por 5 minutos no máximo, controlando o tempo de coloração para cada anticorpo, até surgir uma coloração marrom. Lavar a seguir 4 vezes em água destilada e contra-corar com Hematoxilina de Harris por 40 segundos. Lavar em água corrente, que é mais alcalina que a água destilada, e pingar 4 gotas de hidróxido de amônio. Agitar por alguns segundos. Fazer a diferenciação da Hematoxilina em água amoniacal. A seguir, passar a lâmina em água corrente e em água destilada.

Para a desidratação e montagem: emergir as lâminas em álcool com concentrações crescentes de 70%, 80%, 95% e, finalmente, álcool absoluto, por 5 minutos cada passagem. A seguir, diafenizar por 3 vezes em xilol, durante 5 minutos cada vez. Imediatamente, montar a lâmina com Entellan (Merck), resina para montagem de lâmina com lamínula, secar por período de 5 minutos a 2 dias.

Para calcular o índice de proliferação celular, a porcentagem do número de células positivas para cada anticorpo monoclonal foi considerada em 500 células tumorais visualizadas. O método da quantificação não foi informatizado .

Para a leitura da expressão da β -Catenina pela técnica de imuno-histoquímica , foi considerada a sua positividade tanto no núcleo como no citoplasma das células tumorais. Com referência aos marcadores de proliferação celular PCNA e Ki-67 e , ao p53 , foi somente considerada a expressão da positividade do núcleo das células tumorais. Finalmente , para o c-erb-B2 e GpP , a expressão da positividade destes marcadores , restringiu-se à membrana das células malignas . Estes métodos também não foram informatizados.

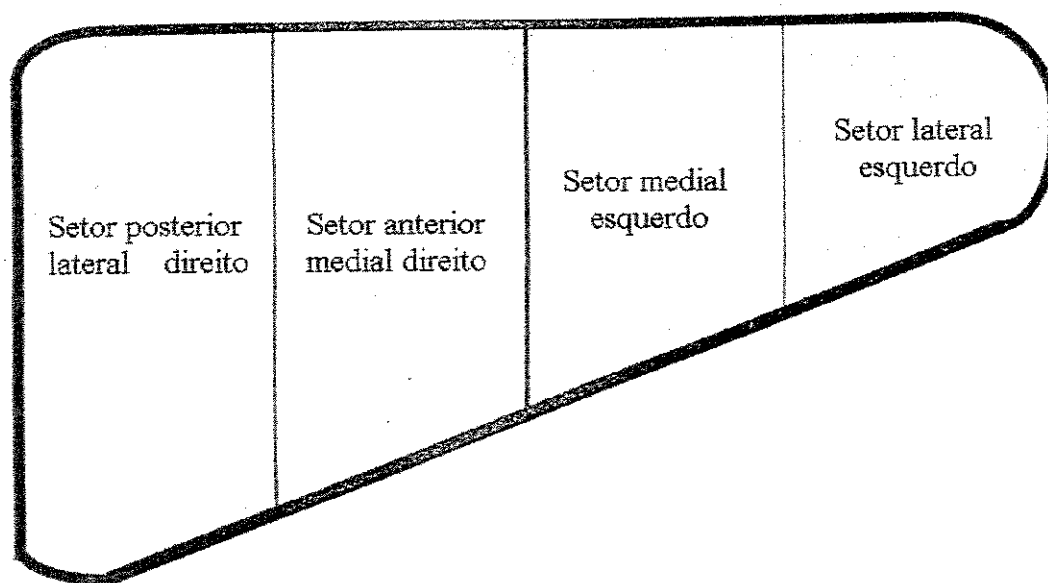
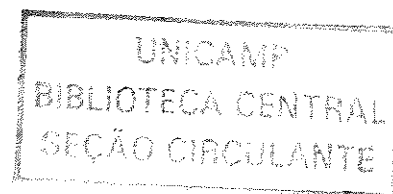


FIGURA 11- Divisão do fígado em setores



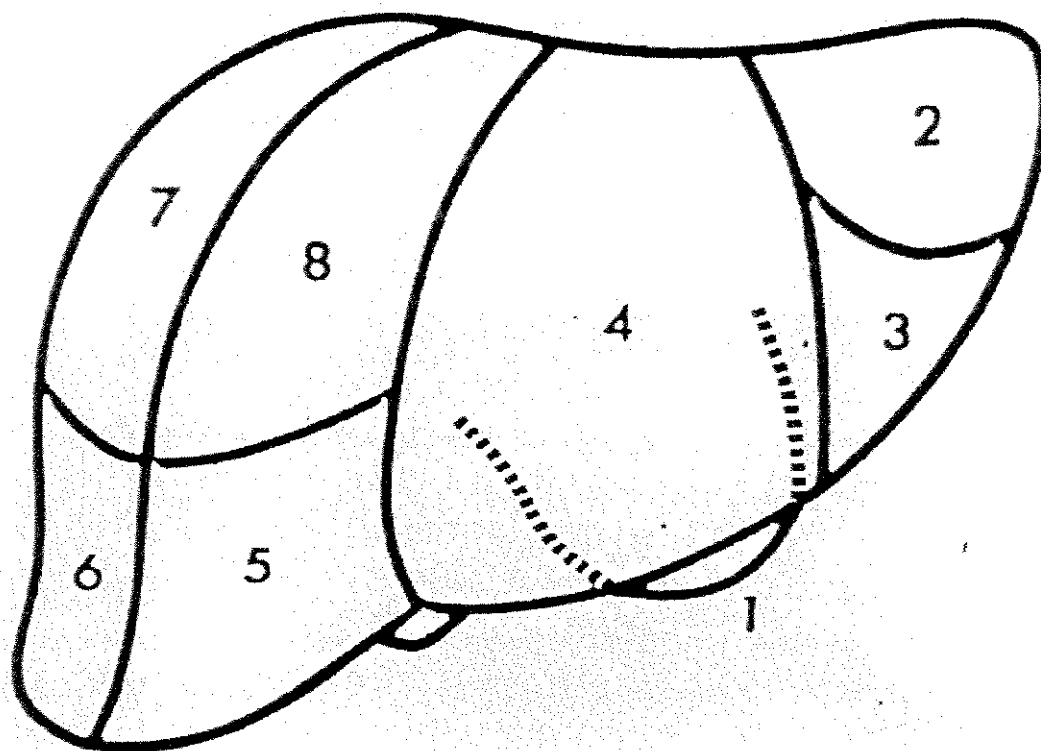
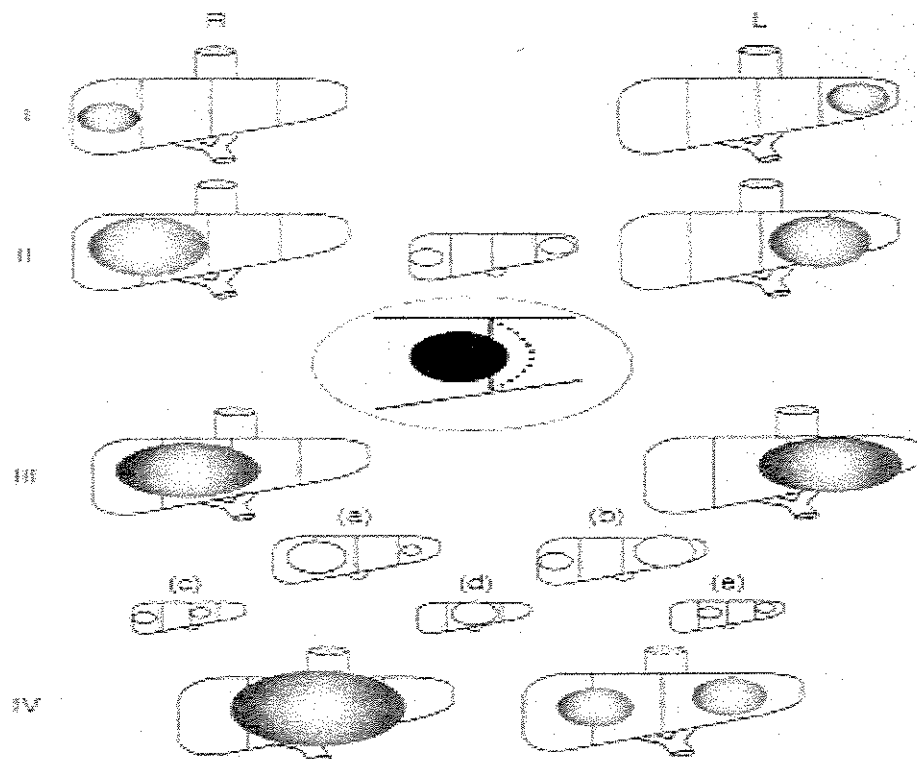


FIGURA 12- Divisão do fígado por segmento



V = EXTENSÃO V. CAVA E/OU HEPÁTICA

P = EXTENSÃO V. PORTA

E = EXTENSÃO EXTRA HEPÁTICA

M = METÁSTASE

FIGURA 13- Sistema de Estadiamento PRETEXT SIOPEL 2

METODOLOGIA PARA A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utiliza sondas , que são fragmentos de DNA , complementares à seqüência de DNA a ser estudada. Estas sondas são marcadas com substâncias fluorescentes (fluorocromos) que são aplicadas diretamente em lâmina contendo o material a ser estudado e , visualizadas em microscópio de fluorescência (JORDE et al , 2000).

A técnica de hibridização *in situ* (FISH) para análise da expressão do p53 foi realizada em 8 pacientes, com sonda de sequência única (LSI p53 (17p13.1), Vysis-Downers Grove, IL, USA, marcada com Spectrum orange), que marca a região p13.1 do cromossomo 17, onde está localizado o gene p53. A sonda é marcada com fluorocromo orange. Na célula normal espera-se encontrar duas marcações vermelhas que representam os dois alelos do p53. Na célula com deleção, visualiza-se somente um sinal vermelho.

O teste de Qui-quadrado foi realizado para a análise estatística de cada marcador.

A sobrevida livre de doença (SLD) e a sobrevida global (SG) foram calculadas de acordo com o método de Kaplan-Meier, (KAPLAN; MEIER, 1958). Para a análise estatística, os pacientes foram analisados a partir do momento do diagnóstico até a progressão da doença, ou recaída, ou morte por qualquer causa na sobrevida livre de eventos, e até a morte na análise da sobrevida global.

4 - RESULTADOS

No período de agosto de 1984 até dezembro de 2001 foram registrados no Centro Infantil Boldrini 25 pacientes com o diagnóstico de hepatoblastoma. Foram excluídos desta análise 4 pacientes pela não obtenção de material de biópsia diagnóstica e/ou de cirurgia em laboratórios externos de anatomia patológica, além do caso nº6, perdido de seguimento após transplante hepático em outro serviço , ao analisarmos as sobrevidas global e livre de eventos.

Dos 21 pacientes incluídos neste estudo, 14 eram do sexo feminino e 7 do sexo masculino, numa proporção de 2:1 (Tabela 1, Figura 14). A maioria foi da raça branca e apenas um paciente era pardo (Tabela 2, Figura 15). O predomínio da raça branca foi estatisticamente significativo ($p = 0,003$). Nenhum dos pacientes era portador de anomalias congênicas associadas.

Quanto ao estado de nutrição ao diagnóstico , quando analisados pela curva de Marcondes e colaboradores (reconhecida pelas Sociedades Paulista e Brasileira de Pediatria, ANEXO III) com relação ao peso e estatura dos 21 pacientes ao diagnóstico, quatro pacientes (19%) estavam entre os percentis 2,5 e 10, três pacientes (14,3%) entre os percentis 10 e 25, dez pacientes (47,6%) entre os percentis 25 e 50 , três pacientes (14,3%) entre os percentis 50 e 75 e apenas um paciente estava entre os percentis 90 e 97,5 (Tabela 3).

TABELA 1- DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA (n) E RELATIVA (%), DO SEXO DOS PACIENTES. COMPARAÇÃO PELO TESTE QUI-QUADRADO DE UMA AMOSTRA ($\alpha = 0,05$)

SEXO	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Feminino	14	66,7
Masculino	7	33,3
TOTAL	21	100,0
Qui-quadrado	$\chi^2 = 0,61$	$p = 0,43$

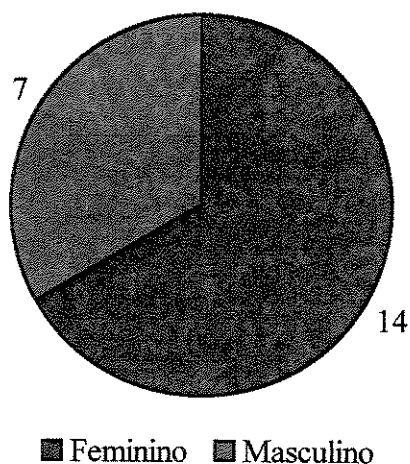


FIGURA 14- Distribuição da freqüência dos pacientes portadores de hepatoblastoma, quanto ao sexo

TABELA 2- DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA (n) E RELATIVA (%), DA COR DOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATOBLASTOMA. COMPARAÇÃO PELO TESTE QUI-QUADRADO DE UMA AMOSTRA ($\alpha = 0,05$)

COR	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Branco	20	95,2
Não Branco	1	4,8
TOTAL	21	100,0
Qui-quadrado	$\chi^2 = 8,65$	p = 0,003*

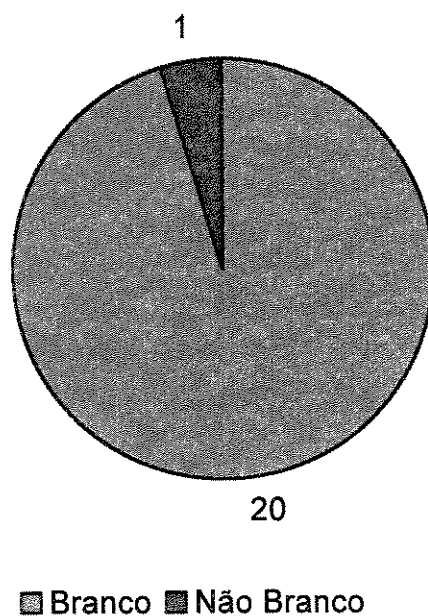


FIGURA 15- Distribuição da frequência dos pacientes com hepatoblastoma quanto à raça

TABELA 3- DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATOBLASTOMA DE ACORDO COM O PESO E ESTATURA AO DIAGNÓSTICO, PELA CURVA DE MARCONDES E COLABORADORES

PERCENTIL	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
2,5 — 10	4	19,0
10 — 25	3	14,3
25 — 50	10	47,6
50 — 75	3	14,3
90 — 97,5	1	4,8
TOTAL	21	100,0

A faixa etária de maior prevalência nos pacientes do estudo ficou entre 6 e 36 meses de vida. Ao diagnóstico, seis dentre os 21 pacientes (28,6%) pertenciam à faixa etária de 0 — 6 meses de idade, nove pacientes (42,8%) tinham idade entre 6 — 36 meses e os restantes 28,6% dos pacientes (seis casos) tinham mais de 36 meses de idade (Tabela 4, Figura 16). Nenhum deles foi prematuro, ou tinha peso de nascimento menor ou igual a 2 quilogramas.

TABELA 4- DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA (n) E RELATIVA (%), DOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATOBLASTOMA, SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA (EM MESES) POR OCASIÃO DO DIAGNÓSTICO. COMPARAÇÃO PELO TESTE QUI-QUADRADO DE UMA AMOSTRA ($\alpha = 0,05$)

FAIXA ETÁRIA (mês)	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
0 — 6	6	28,6
6 — 36	9	42,8
36 —	6	28,6
TOTAL	21	100,0
Qui-Quadrado	$\chi^2 = 0,40$	P = 0,82

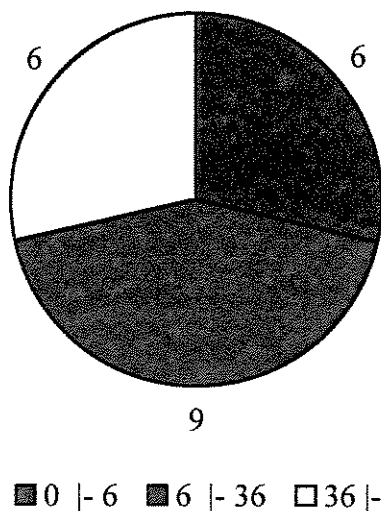


FIGURA 16- Distribuição da frequência dos pacientes portadores de hepatoblastoma segundo a faixa etária em meses, ao diagnóstico

Objetivando a uniformidade dos diagnósticos histopatológicos dos casos estudados, foi feita a revisão por pelo menos dois patologistas experientes (Profa. Dra. Izilda Aparecida Cardinalli, do Centro Infantil Boldrini / USF e uma segunda opinião entre os seguintes patologistas Prof. Dr. Arthur Zimmermann, da Universidade de Bernn, Profa. Dra. Cecília Escanhoela, da UNICAMP e Prof. Dr. Marcelo Alvarenga, da PUCC / IPC/ CAISM UNICAMP), com nível de concordância dos subtipos histológicos em 100%.

Confirmou-se o diagnóstico de hepatoblastoma do tipo fetal puro em 11 pacientes (52,4%), hepatoblastoma do tipo misto (fetal/embrionário) em 8 pacientes (38%), um caso de hepatoblastoma tipo macrotrabecular (4,8%) e um, do tipo misto teratóide (Figura 17).

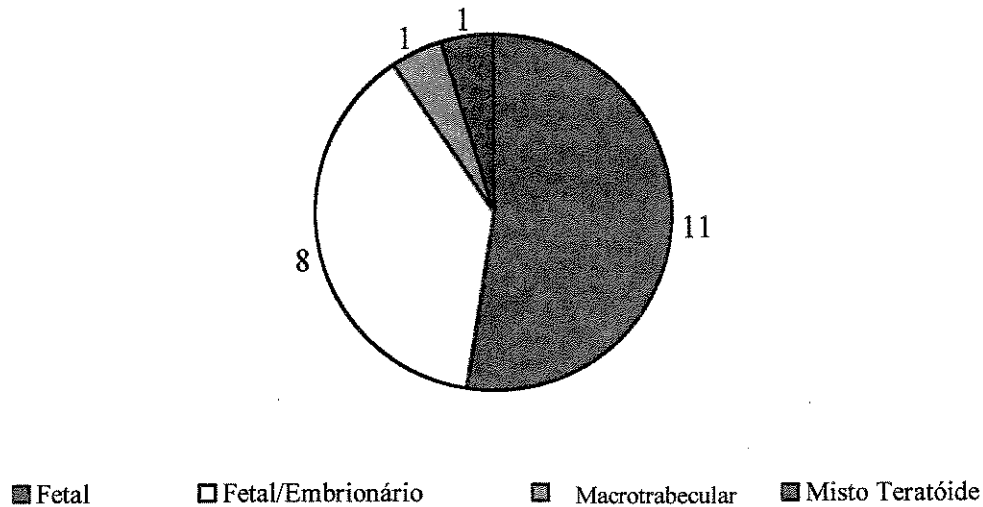


FIGURA 17- Distribuição de freqüência dos pacientes portadores de hepatoblastoma segundo o subtipo histológico

Com relação ao estadio dos pacientes classificados de acordo com os critérios do PRETEXT/SIOPEL, a maioria pertencia ao grupo II, ou seja, o tumor abrangia 2 setores hepáticos, sendo os dois setores adjacentes livres. A distribuição dos 21 pacientes quanto à extensão da doença mostrou que quatro pacientes (19%) eram do grupo I, onze pacientes (52,4%) do grupo II, cinco pacientes (23,8%) do grupo III e apenas um paciente (4,8%) do grupo IV (Tabela 5, Figura 22).

TABELA 5- DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA (n) E RELATIVA (%), DOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATOBLASTOMA, SEGUNDO O GRUPO DE ESTADIAMENTO (PRETEXT/SIOPEL)

GRUPO DE ESTADIAMENTO	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
I	4	19,0
II	11	52,4
III	5	23,8
IV	1	4,8
TOTAL	21	100,0

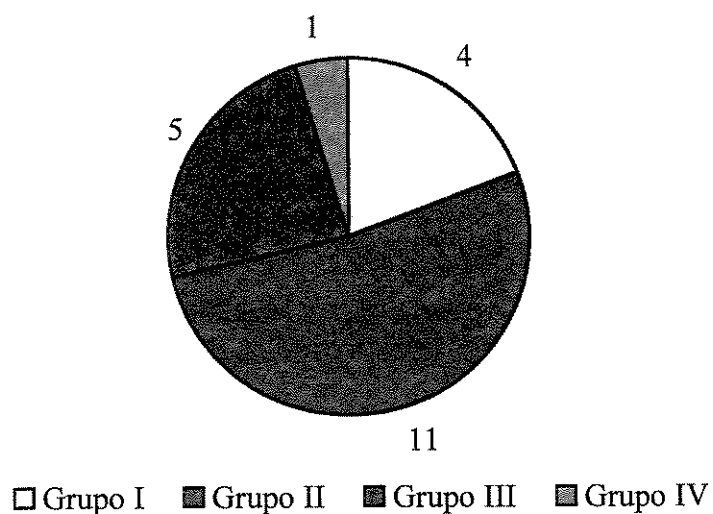


FIGURA 18- Distribuição de frequência dos pacientes portadores de hepatoblastoma segundo o grupo de estadiamento PRETEXT/SIOPEL

Quanto ao envolvimento extra-hepático pelo tumor ao diagnóstico, três casos tinham metástase pulmonar (casos n^{os} 5 ,6 e 12). Os casos n^{os} 5 e 12 faleceram por progressão do tumor, refratário à quimioterapia. O caso n^o 6 apresentou recidiva hepática

após a primeira terapia, trocando o esquema quimioterápico por duas vezes. Foi posteriormente submetido a transplante hepático em outro Serviço, sendo perdido de seguimento, ainda em remissão clínica e laboratorial, após três meses.

Quatro casos apresentavam envolvimento de veia porta ao diagnóstico (casos n^{os} 7, 8, 10 e 19). Seis casos apresentavam envolvimento da veia cava (casos n^{os} 7, 8, 9, 10, 12 e 15) e apenas um caso tinha envolvimento extra-hepático pelo tumor (caso n^o 10).

Quanto à ocorrência de recidivas, além do caso n^o 6 previamente citado, dois outros pacientes (casos n^o 7 e 12) apresentaram recidiva pulmonar isolada. Destes, o caso n^o 7 recidivou para o pulmão, bilateralmente, três meses após o término de sua terapia. Este paciente era do grupo III VP, histologia do tipo fetal puro, com ressecção completa do tumor primário e de sua extensão para veias cava e porta, na primeira terapia. Ele está vivo, em 2^a remissão clínica completa há 92 meses.

No presente estudo, o momento cirúrgico foi previsto ao redor da semana 12^a, após o tratamento com 4 ciclos de quimioterapia. O objetivo desta estratégia visava não só a redução do tumor, facilitando sua ressecabilidade, como também, avaliar a resposta do tumor ao esquema quimioterápico utilizado. Dois pacientes (casos n^{os} 1 e 5) tiveram a ressecção cirúrgica como a primeira modalidade de tratamento.

A cirurgia programada para a ressecção do tumor foi realizada em 16 pacientes que fizeram a quimioterapia pré-operatória, conforme planejado. Em todos, o tumor foi totalmente ressecado no ato cirúrgico, sendo 12 com margens livres de doença (75% dos casos) e 4 pacientes (25% dos casos) com margens microscopicamente comprometidas (Tabela 6). Três pacientes não foram submetidos à cirurgia programada: um faleceu por sepse (caso n^o 3) e dois, por progressão de tumor refratário à quimioterapia (casos n^o 2 e 21).

TABELA 6- DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA (n) E RELATIVA (%), DOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATOBLASTOMA, SEGUNDO A RESSECÇÃO CIRÚRGICA DO TUMOR

RESSECÇÃO CIRURGICA	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Ao diagnóstico	2	9,5
Após QT com Margens Livres	12	57,1
Após QT com Margens Comprometidas	4	19,0
Inoperáveis	3	14,3
TOTAL	21	100,0

QT = quimioterapia

A boa resposta à quimioterapia e a ressecção completa do tumor com margens livres, representam os alicerces para a cura da criança. O grupo do estudo, avaliado 19 anos após, mostrou que 11 pacientes estão vivos e em remissão clínica completa, sendo a última avaliação feita em abril de 2003. Na Tabela 7 estão contidos os dados globais da caracterização clínica, patológica e terapêutica dos 21 pacientes com hepatoblastoma e sua correlação com a sobrevida, analisada no período de agosto de 1984 até abril de 2003.

TABELA 7- CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, PATOLÓGICA E TERAPÊUTICA DOS 21 PACIENTES COM HEPATOBLASTOMA E A SOBREVIDA ANALISADA

Nº	SEXO	COR	DATA DE NASCIMENTO	DATA DO DIAGNÓSTICO	IDADE AO DIAGNÓSTICO (mês)	GRUPO	SUBTIPO HISTOPATOLÓGICO	PROTOCOLO DE QUIMIOTERAPIA	CIRURGIA	CONDIÇÃO ATUAL	TEMPO DE SOBREVIDA (mês)
1	F	Branca	22/11/83	13/08/84	9	I	Fetal/Embrionário	CCG	ao Diag	OS	1
2	M	Branca	22/01/81	22/03/85	50	II	Fetal	CCG	Inoperável	OT	13
3	M	Branca	24/11/88	04/04/89	5	II	Misto Teratóide	CDDP/ADR	Inoperável	OS	3
4	M	Branca	31/07/85	01/07/91	71	II	Fetal	SIOPEL1	Total	RCC	141
5	F	Branca	20/12/87	17/08/93	68	II M	Fetal/Embrionário	SIOPEL1	ao Diag	OT	8
6	F	Branca	14/04/92	01/03/94	23	II M	Fetal/Embrionário	SIOPEL1	Total	Desconhecida	
7	M	Parda	25/03/93	30/04/94	13	III VP	Fetal	SIOPEL1	Total	RCC	107
8	F	Branca	29/11/94	11/05/95	6	II VP	Fetal	SIOPEL1	Total	RCC	95
9	F	Branca	10/01/95	25/04/96	15	III V	Fetal/Embrionário	SIOPEL2	Total	OS	6
10	M	Branca	28/08/96	07/10/96	2	I VPE	Fetal	SIOPEL2	Micro	RCC	78
11	F	Branca	26/11/96	02/05/97	6	II	Fetal/Embrionário	SIOPEL2	Total	OS	5
12	F	Branca	03/05/84	29/07/97	158	II VM	Fetal	SIOPEL2	Total	OT	14
13	F	Branca	08/07/87	12/11/97	124	III	Fetal/Embrionário	SIOPEL2	Total	RCC	65
14	M	Branca	26/08/97	30/09/98	13	I	Fetal	SIOPEL2	Micro	RCC	55
15	F	Branca	07/05/97	04/04/98	11	II V	Fetal/Embrionário	SIOPEL3	Total	OT	18
16	F	Branca	24/05/98	26/04/99	11	II	Fetal/Embrionário	SIOPEL3	Total	RCC	47
17	F	Branca	09/11/98	16/07/99	8	III	Fetal	SIOPEL3	Total	RCC	45
18	F	Branca	23/12/98	25/05/00	17	I	Fetal	SIOPEL3	Micro	RCC	35
19	M	Branca	13/05/00	13/06/00	1	III P	Fetal	SIOPEL3	Total	RCC	34
20	F	Branca	05/07/00	29/08/00	1	II	Fetal	SIOPEL3	Micro	RCC	32
21	F	Branca	06/07/91	20/08/01	121	IV	Macrotrabecular	SIOPEL3	Inoperável	OT	14

M Masculino	M Metástase	E	Extensão extra-hepática do tumor	OT	Óbito por progressão de tumor refratário à quimioterapia
F Feminino	V Extensão para v. cava e/ou v. hepática	Micro	Ressecção total do tumor com margens comprometidas	OS	Óbito por sepse decorrente da neutropenia pós – quimioterapia
	P Extensão para v. porta	Total	Ressecção total do tumor com margens livres	RCC	Vivo, em remissão clínica completa

Nove pacientes faleceram. Dois deles por sepse secundária a neutropenia pós-quimioterapia. O caso nº 1 foi a óbito por infecção, na cidade de origem. Não temos informação sobre sua evolução clínica nesta internação por febre e neutropenia, nem resultados de culturas. O caso nº 3 evoluiu para óbito durante episódio de neutropenia febril e o único agente isolado foi em secreção orotraqueal (*Pseudomonas aeruginosa*). O caso nº 9 faleceu por infecção grave na 2ª semana do pós-operatório, caracterizada pela presença de abscesso peri-hepático e necrose tubular renal, em exame de necrópsia, embora nenhum agente bacteriano tivesse sido isolado. O caso de nº 11 evoluiu para óbito na 4ª semana do pós-operatório, em outro Serviço, com insuficiência hepática e sepse, também sem agente infeccioso isolado em culturas.

Cinco pacientes refratários à quimioterapia morreram por progressão da doença (casos nºs 2, 5, 12, 15 e 21). O caso nº 5 morreu na cidade de origem, com insuficiência cardíaca congestiva, por progressão do tumor após o 4º ciclo de quimioterapia. Apresentava ao ecocardiograma fração de ejeção de 0,49%, com diminuição contrátil do ventrículo esquerdo, presença de massa aderida ao ventrículo direito, com obstrução da via de saída e insuficiência tricúspide. A condição atual dos 21 pacientes analisados está contida na Tabela 8.

TABELA 8- DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA (n) E RELATIVA (%), DOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATOBLASTOMA, SEGUNDO A CONDIÇÃO ATUAL DO PACIENTE (AVALIAÇÃO EM ABRIL 2003)

SITUAÇÃO ATUAL	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Óbito por Sepse	4	19,0
Óbito por Progressão do Tumor	5	23,8
Remissão Clínica Continua	11	52,4
Desconhecida	1	4,8
TOTAL	21	100,0

Uma paciente (caso nº 6) apresentou quatro meses após o término de sua terapia, aumento da α -feto proteína sérica (1064,8 ng/ml), embora os exames de imagem na ocasião (ressonância de abdome e tomografia de tórax) não apresentassem presença de tumor mensurável. Com o diagnóstico de recidiva, a paciente reiniciou a quimioterapia com Ifosfamida e Etoposide (3 ciclos), sem diminuição dos níveis da α -feto proteína sérica e com o aparecimento subsequente de lesão em parênquima hepático. Trocado o esquema de quimioterapia para Vincristina, 5-Fluoracil e Carboplatina, realizando 8 ciclos, com boa resposta a este novo esquema. Foi submetida a transplante hepático em outro Serviço. Três meses após este procedimento, apresentava níveis séricos de α -feto proteína e exames de imagem normais. Foi posteriormente perdido o seguimento desta paciente.

A terapêutica utilizada para estes 21 pacientes variou de acordo com a época de registro de cada um deles no Centro Infantil Boldrini. Sessenta e cinco por cento dos pacientes do estudo foram tratados com protocolos mais modernos (SIOPEL 1, 2 e 3) com cifras de cura entre 50 e 71,5%, sendo expressivo o progresso terapêutico após a implantação destes protocolos (Tabela 9). Dezoito pacientes foram tratados de acordo com os protocolos SIOPEL, dois pacientes conforme o protocolo CCG 881/POG 8103 e um paciente recebeu apenas um ciclo de Cisplatina e Adriblastina (Figura 19).

TABELA 9- DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA (n) E RELATIVA (%), DA SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATOBLASTOMA SEGUNDO O PROTOCOLO DE TRATAMENTO UTILIZADO

	SITUAÇÃO ATUAL			TOTAL DE PACIENTES
	Óbito (n)	Vivo		
		n	%	
CCG	2	-	0,0	2
CDDP/ADR	1	-	0,0	1
SIOPEL 1	1	3	75	5*
SIOPEL 2	3	3	50	6
SIOPEL 3	2	5	71,5	7
TOTAL	9	11		21

*excluído o caso nº 6 por perda de seguimento

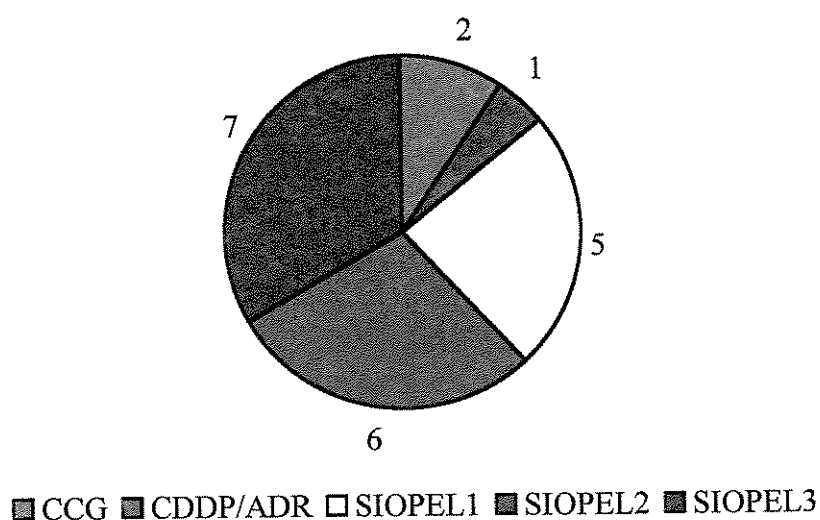


FIGURA 19- Distribuição de frequência dos pacientes portadores de hepatoblastoma segundo o protocolo terapêutico utilizado

Para a análise de Sobrevida Livre de Eventos foram considerados 20 pacientes pois um deles foi excluído por perda de seguimento (caso nº 6). Este caso, entretanto, foi incluído nas análises até o momento do abandono, exceto para a análise de sobrevida global.

Em 19 anos de seguimento, o maior período de sobrevida é a do caso nº 4, 141 meses. A sobrevida global em 12 anos de todos os pacientes do estudo é de 55%. Nesse mesmo período a sobrevida livre de eventos é de 50%, de acordo com o método de Kaplan-Meier (Figuras 20 e 21).

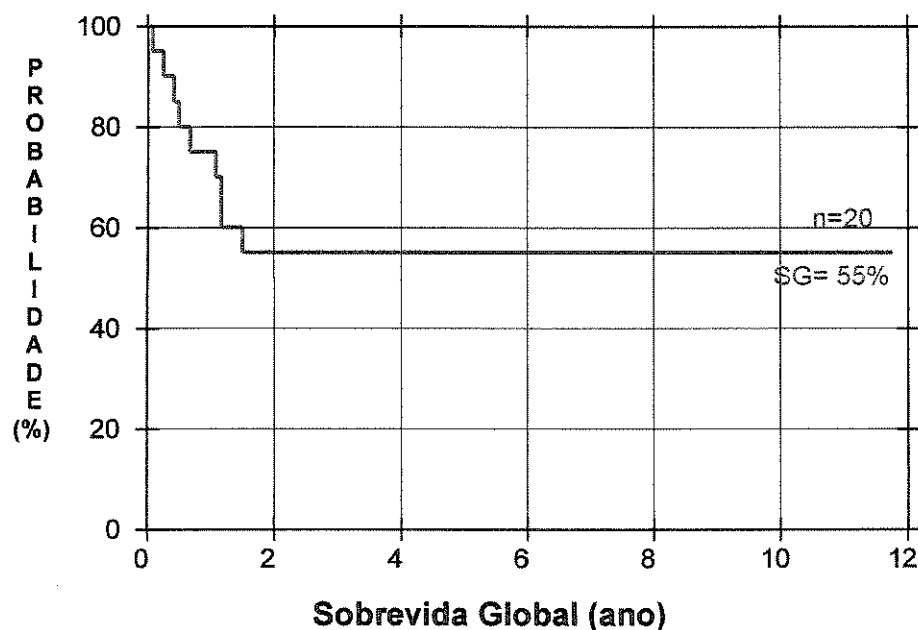


FIGURA 20- Sobrevida Global avaliada em 12 anos nos 20 pacientes com hepatoblastoma

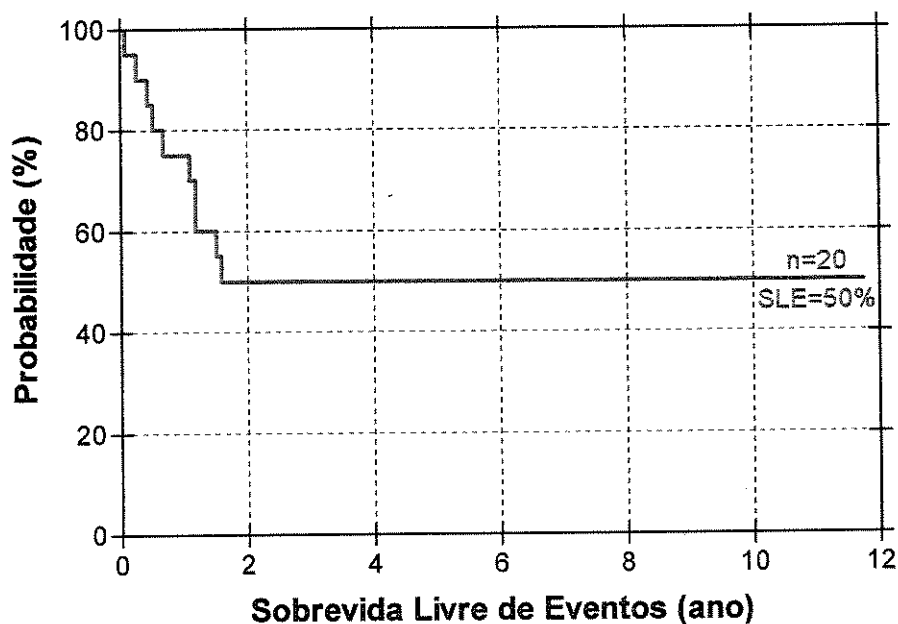


FIGURA 21- Sobrevida Livre de Eventos avaliada em 12 anos nos 20 pacientes com hepatoblastoma

A sobrevivida livre de eventos dos 20 pacientes, estratificados de acordo com o protocolo terapêutico utilizado, foi de 71,5% em 4 anos para o protocolo SIOPEL 3 ($n = 7$), 50% em 6 anos para o protocolo SIOPEL 2 ($n = 6$), 50% em 12 anos para o protocolo SIOPEL 1 ($n = 4$; excluído caso nº 6, por perda de seguimento após transplante hepático em outro Serviço) e zero para os pacientes que utilizaram os demais esquemas terapêuticos (Figura 22).

De acordo com o grupo de estadiamento (PRETEXT/SIOPEL), a sobrevivida livre de eventos para os 20 pacientes portadores de hepatoblastoma foi de 75% em 6 anos para os pacientes do grupo I ($n = 4$), 40% em 12 anos para os pacientes do grupo II ($n = 10$, excluído caso nº 6), 60% em 5 anos para os pacientes do grupo III ($n = 5$) e de zero para o paciente do grupo IV (Figura 23).

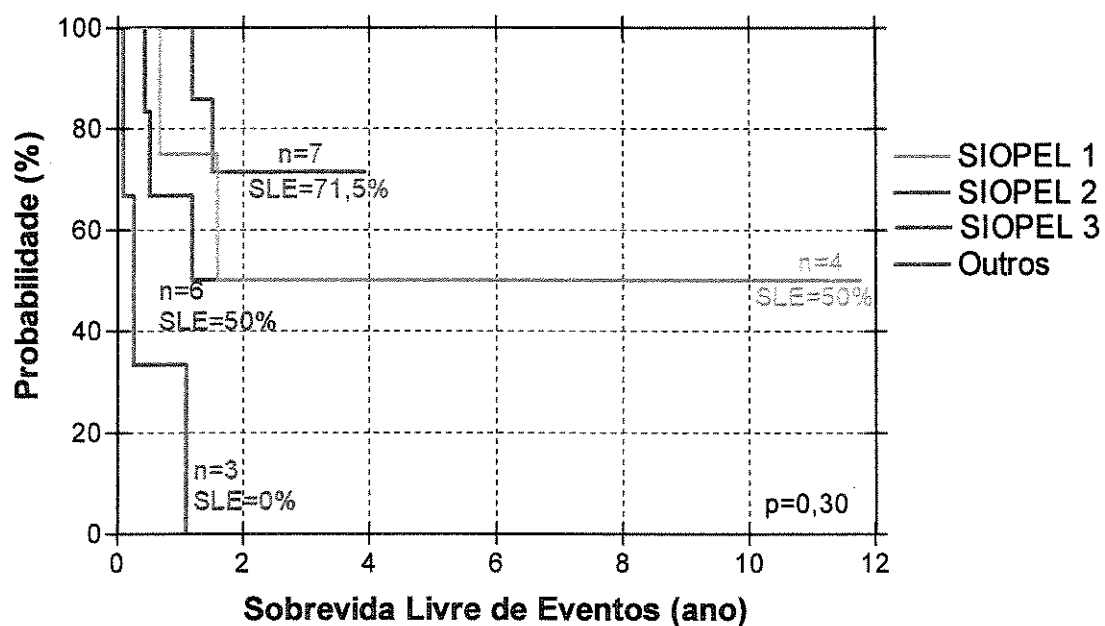


FIGURA 22- Sobrevida Livre de Eventos para 20 casos de Hepatoblastoma de acordo com o protocolo terapêutico utilizado

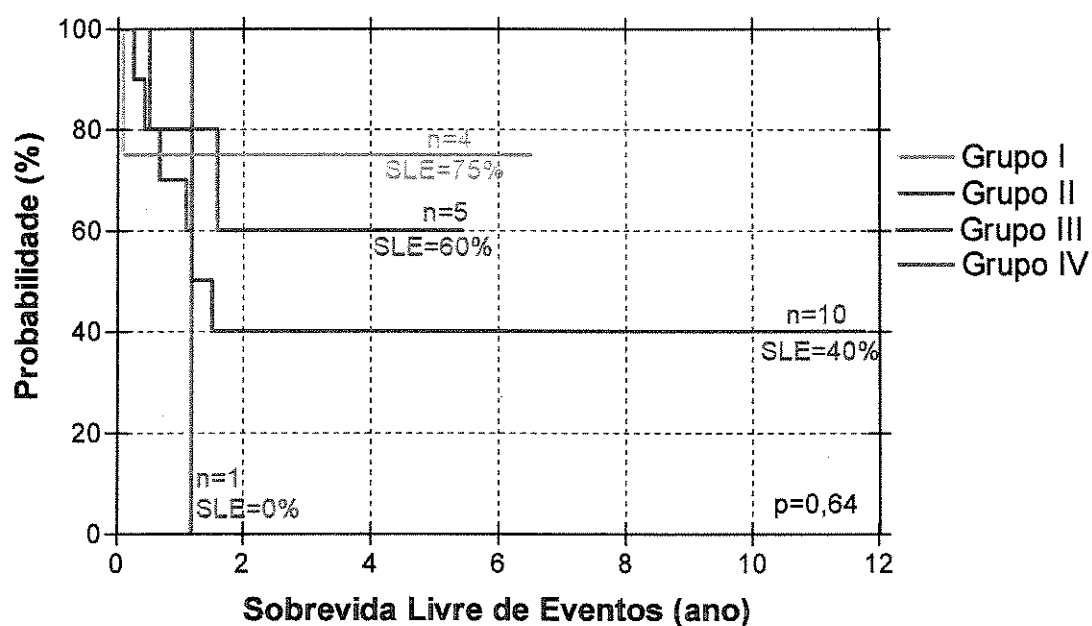


FIGURA 23- Sobrevida Livre de Eventos para 20 casos de Hepatoblastoma de acordo com o grupo clínico ao diagnóstico

Quanto à análise da sobrevida dos pacientes de acordo com o subtipo histológico, o prognóstico favorável se restringiu de maneira significativa ao subtipo fetal puro, onde dos 11 casos descritos, 9 estão vivos, sem evidência de doença, com uma sobrevida em 12 anos de 72,7% . A Figura 24 mostra as curvas de sobrevida livre de eventos de acordo com os subtipos histológicos fetal puro e fetal/embrionário.

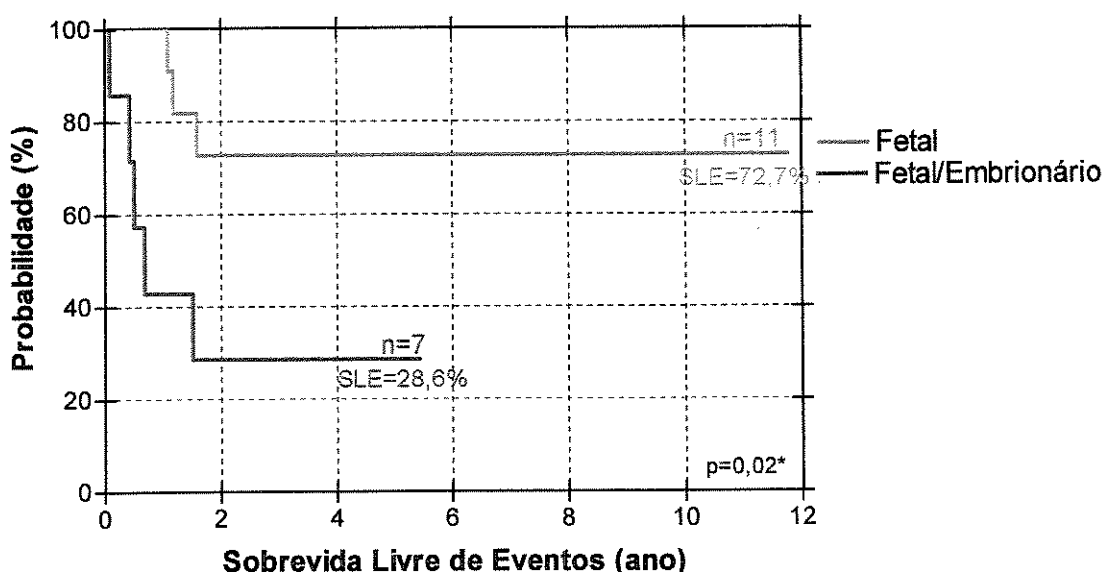


FIGURA 24- Sobrevida Livre de Eventos entre os pacientes com hepatoblastoma de acordo com os subtipos histológicos fetal puro e fetal embrionário

A presença do componente embrionário ao tipo fetal (8 pacientes) reduziu a taxa de cura para 28,6%. Deste grupo, um paciente foi perdido de seguimento (caso nº 6) e 2 morreram de infecção pós-operatória (casos nºs 9 e 11), e 1 por sepse (caso nº1). Apenas dois pacientes deste grupo, foram a óbito por progressão de doença (casos nºs 5 e 15).

A tabela 10 discrimina a situação atual de todos os 20 pacientes, de acordo com os subtipos histológicos. Quando a comparação da sobrevida livre de eventos foi feita de acordo com todos os subtipos anatomopatológicos, a presença do componente fetal foi estatisticamente significativa ($p = 0,02^*$).

TABELA 10- DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA SITUAÇÃO ATUAL DOS PACIENTES SEGUNDO O SUBTIPO HISTOPATOLÓGICO. COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS DO SUBTIPO FETAL E DO FETAL/EMBIONÁRIO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

SUBTIPO HISTOPATOLÓGICO	DESFECHO CLÍNICO			
	TOTAL	Vivo		Óbito
		n	%	
Fetal Puro	11	9	88%	2
Fetal/Embrionário	7	2	29%	5
Macrotrabecular	1	0	0	1
Misto Teratóide	1	0	0	1
TOTAL	20	11	55%	9

p = 0,02*

Uma possível associação entre os achados imuno-histoquímicos dos marcadores de proliferação celular do tumor e o prognóstico dos pacientes, foi pesquisada em 21 pacientes, no momento da biópsia diagnóstica (Tabela 11) e no momento da cirurgia realizada após 4 ciclos de quimioterapia (Tabela 12).

TABELA 11- DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA (n) E RELATIVA (%), DOS PACIENTES DE ACORDO COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES NO MATERIAL OBTIDO AO DIAGNÓSTICO (BIÓPSIA)

MARCADOR DE IMUNO- HISTOQUÍMICA	BIÓPSIA				TOTAL DE EXAMES
	Ausência		Presença		REALIZADOS
	n	%	n	%	n
β-Catenina	7	41,2	10	58,8	17
PCNA	0	0,0	14	100,0	14
Ki-67	2	11,8	15	88,2	17
p53	16	94,1	1	5,9	17
c-erb-B2	6	42,9	8	57,1	14
GpP	15	88,2	2	11,8	17
TOTAL	46	47,9	50	52,1	96

Resultados

TABELA 12- DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA (n) E RELATIVA (%), DOS PACIENTES DE ACORDO COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DA EXPRESSÃO DE CADA MARCADOR NO MOMENTO CIRÚRGICO (PARA RESSECÇÃO DO TUMOR PRIMÁRIO), APÓS 4 CICLOS DE QUIMIOTERAPIA*

MARCADOR DE IMUNO- HISTOQUÍMICA	EXPRESSÃO DOS MARCADORES NA PEÇA CIRÚRGICA				TOTAL
	Ausência		Presença		
	n	%	n	%	
	n	%	n	%	
β-Catenina	2	12,5	14	87,5	16
PCNA	1	6,7	14	93,3	15
Ki-67	11	84,6	2	15,4	13
p53	15	93,8	1	6,2	16
c-erb-B2	3	21,4	11	78,6	14
GpP	11	68,8	5	31,2	16
TOTAL	43	47,8	47	52,2	90

*Exceto nos casos 1 e 5, que fizeram cirurgia ao diagnóstico, sem o uso de quimioterapia prévia.

Ao diagnóstico, os marcadores mais expressivos foram o PCNA e o Ki-67, com 100% e 88,2% de positividade, respectivamente. A menor expressão foi para o p53, positivo pela técnica de imuno-histoquímica em apenas um paciente (caso nº 13). Quando a expressão gênica do p53 foi pesquisada pela técnica de hibridização *in situ* (FISH), dos 8 casos pesquisados (casos nºs 2, 4, 7, 8, 9, 12, 13 e 15) 5 casos foram positivos (casos nº 2, 7, 9, 12 e 13). Níveis intermediários de positividade foram registrados com a β -Catenina e c-erb-B2. A GpP não apresentou resultados significativos.

A Figura 25 contém a distribuição da expressão dos seis marcadores estudados nesta pesquisa, no momento do diagnóstico do hepatoblastoma.

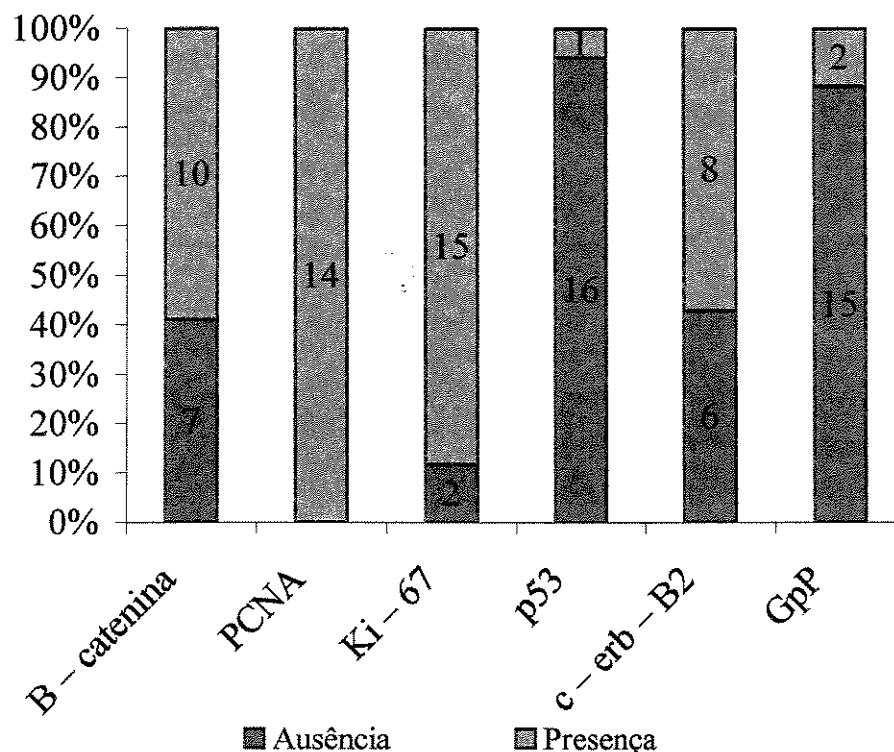


FIGURA 25- Distribuição de freqüência dos pacientes portadores de hepatoblastoma de acordo com a ausência ou presença da expressão de cada marcador no material obtido da biópsia ao diagnóstico

No momento da cirurgia programada, dezesseis pacientes tiveram os marcadores de proliferação celular quantificados. As maiores expressões de positividade neste momento, foram registradas com a β -Catenina, o PCNA e o C-erb-B2 em 87,5%, 93,3% e 78,6%, respectivamente. Os níveis de Ki-67 diminuíram significativamente em relação aos valores pré-quimioterapia chegando a 15,4%. O p53 avaliado com técnica de imuno-histoquímica não mostrou alteração (Figura 26).

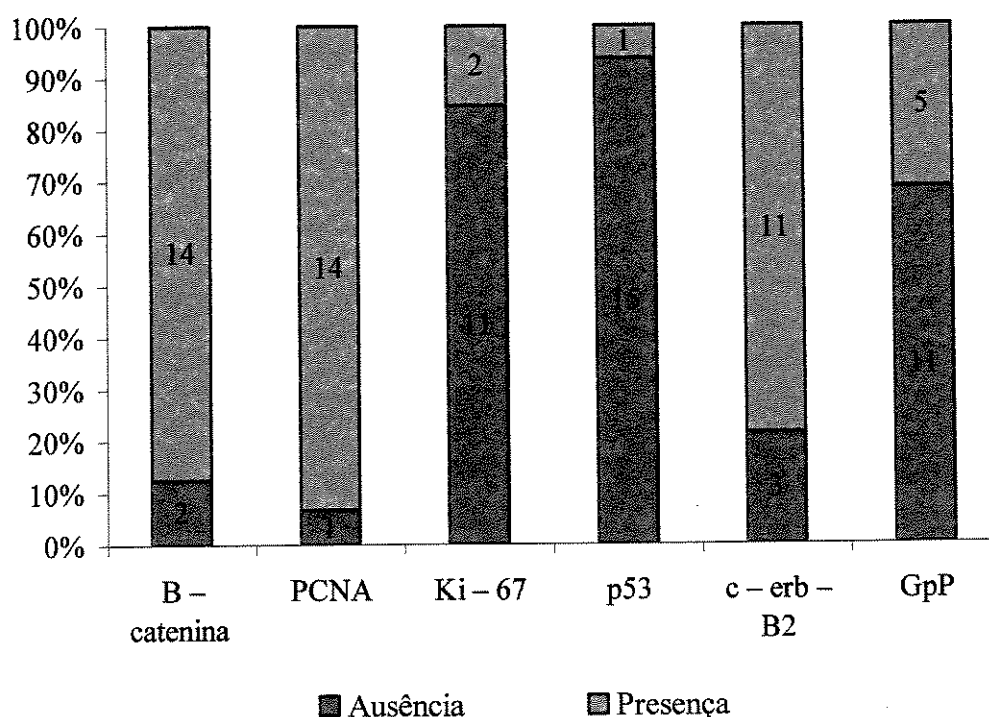


FIGURA 26- Distribuição de freqüência dos pacientes portadores de hepatoblastoma de acordo com a ausência ou presença da expressão de cada marcador no material obtido no momento cirúrgico para ressecção do tumor

A Tabela 13 contém o resultado geral dos estudos de imuno-histoquímica realizados no momento da biópsia diagnóstica, por ocasião da cirurgia do tumor após uso de quimioterapia, associado ao subtipo histológico e à sobrevida dos 21 casos de hepatoblastoma analisados neste estudo.

No momento do diagnóstico, foi realizado o estudo de imuno-histoquímica para a pesquisa do marcador de proliferação celular (PCNA) em 14 pacientes. O resultado foi positivo em todos. A sobrevida global em 12 anos para estes pacientes de acordo com a positividade do PCNA ao diagnóstico, foi de 64,3% (Figura 27). Foram estudados 15 espécimes cirúrgicas, após quimioterapia (exceto o caso nº 1, cujo resultado do PCNA foi positivo e a criança foi operada ao diagnóstico, sem uso prévio de quimioterapia) para o PCNA. Os resultados se mostraram positivos em 14 casos e negativo em apenas um caso

(nº 4), cujo subtipo histológico era fetal puro. Este paciente está vivo, sem evidência de doença há 12 anos. A taxa de sobrevida global para os pacientes com PCNA positivo no momento da cirurgia programada foi de 76,9% em 9 anos (Figura 28).

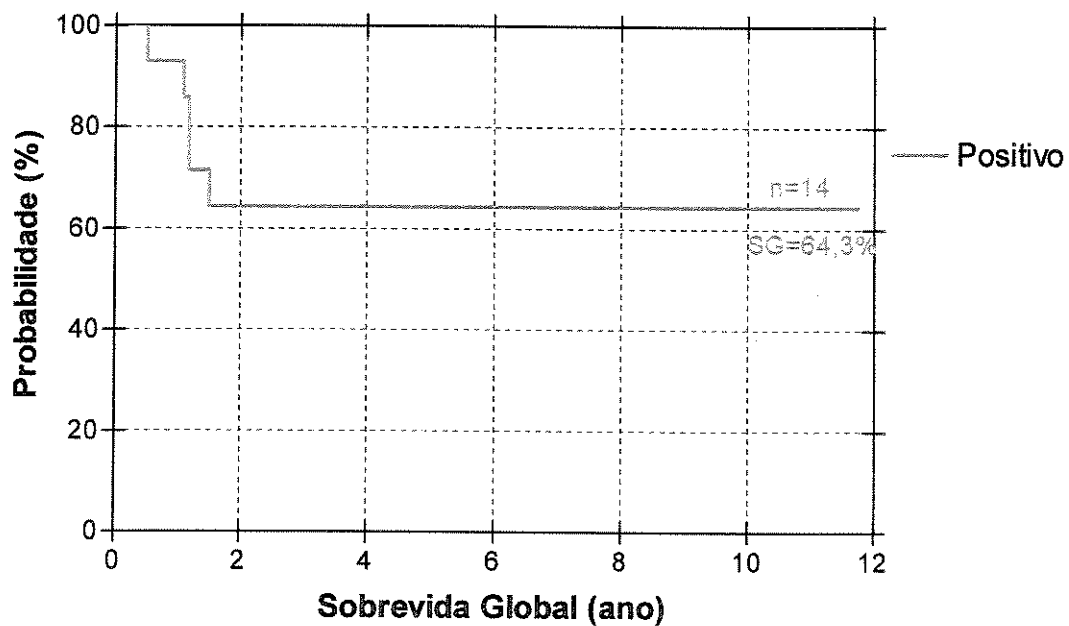


FIGURA 27- Sobrevida Global segundo a expressão do PCNA no momento da biópsia diagnóstica nos pacientes com Hepatoblastoma

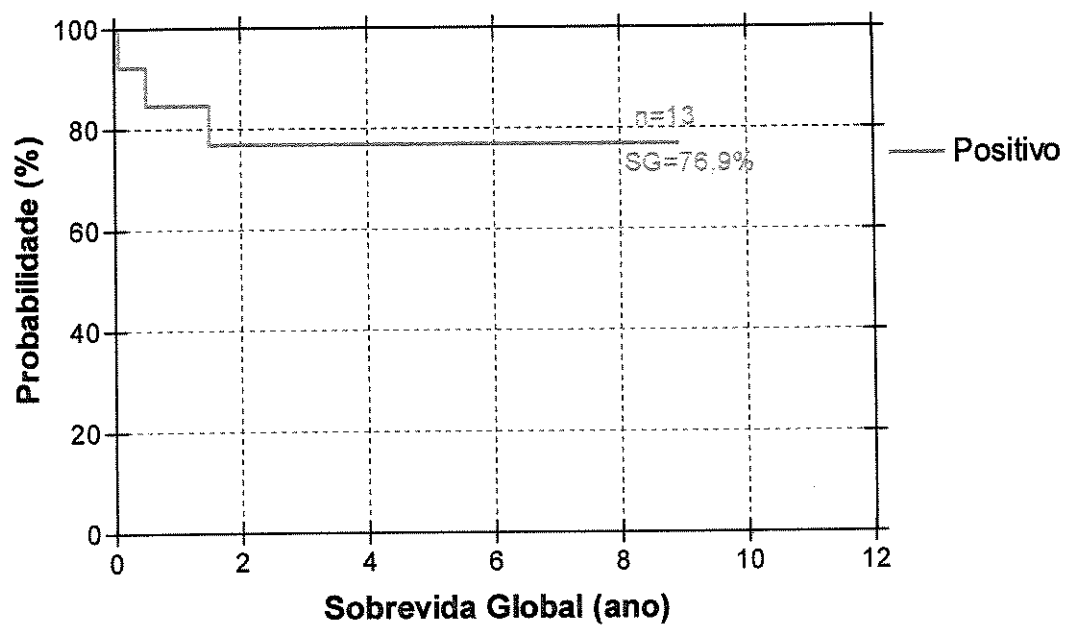


FIGURA 28- Sobrevida Global segundo a expressão do PCNA no momento da cirurgia nos pacientes com Hepatoblastoma

A Figura 29 abaixo apresenta, comparativamente, a expressão da positividade do PCNA antes (momento da biópsia diagnóstica) e após 4 ciclos de quimioterapia (momento da ressecção cirúrgica do tumor). Não houve variação desta expressão com a quimioterapia empregada.

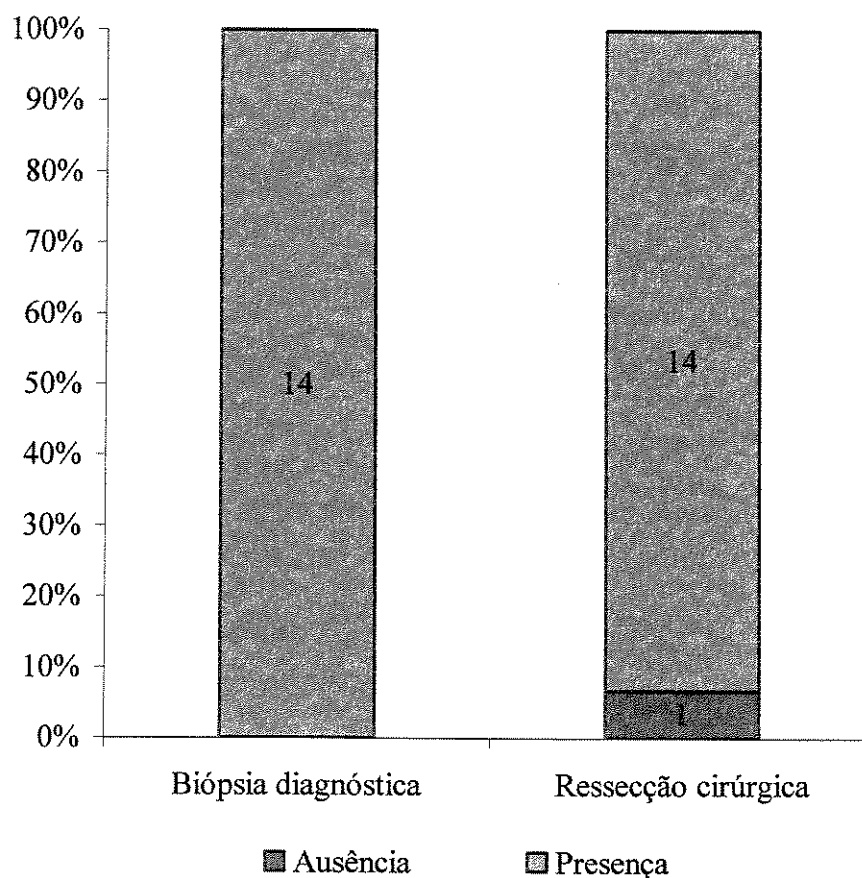


FIGURA 29- Distribuição de frequência dos pacientes de acordo com a ausência ou presença da expressão do PCNA no material retirado da biópsia ao diagnóstico e na ressecção cirúrgica do tumor

Os estudos de imuno-histoquímica para o Ki-67 foram realizados no momento da biópsia diagnóstica em 17 pacientes, sendo o resultado positivo em 15 casos (88,3%). A sobrevida global para os doentes que expressavam a positividade deste marcador, avaliada

em 12 anos de seguimento, foi de 66,7% (Figura 30). Os 2 casos com resultado negativo para o Ki-67 faleceram por progressão de tumor refratário à quimioterapia, sendo um deles (caso nº 2) de subtipo histológico fetal puro e o outro, do subtipo fetal/embrionário (caso nº 5). Nos pacientes com expressão do Ki-67 ao diagnóstico, que obtiveram a negatificação deste marcador no momento da cirurgia tiveram melhores taxas de sobrevida livre de eventos (SG=90%).

Em 11 pacientes o resultado do Ki-67 avaliado na peça cirúrgica foi negativo. Nestes, a sobrevida global em 12 anos foi de 90 % (Figura 31). Nos dois casos com resultado positivo do Ki-67 no momento cirúrgico (casos nºs 15 e 16), a curva de sobrevida livre de eventos destes pacientes, em 4 anos de acompanhamento, foi de 50%, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa ($p = 0,22$).

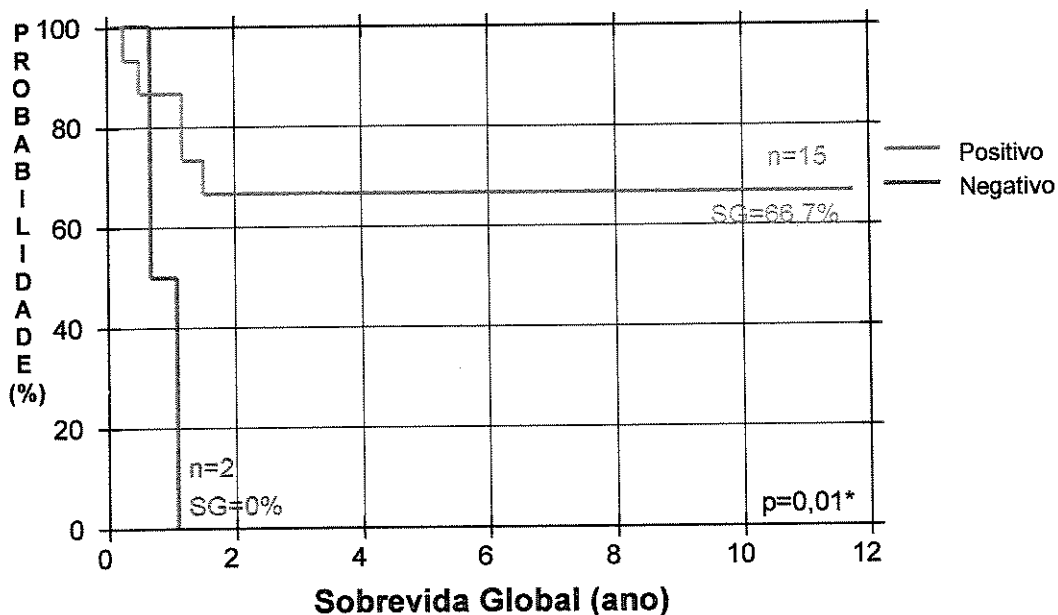


FIGURA 30- Sobrevida Global segundo a expressão do Ki-67 no momento da biópsia diagnóstica nos pacientes com hepatoblastoma

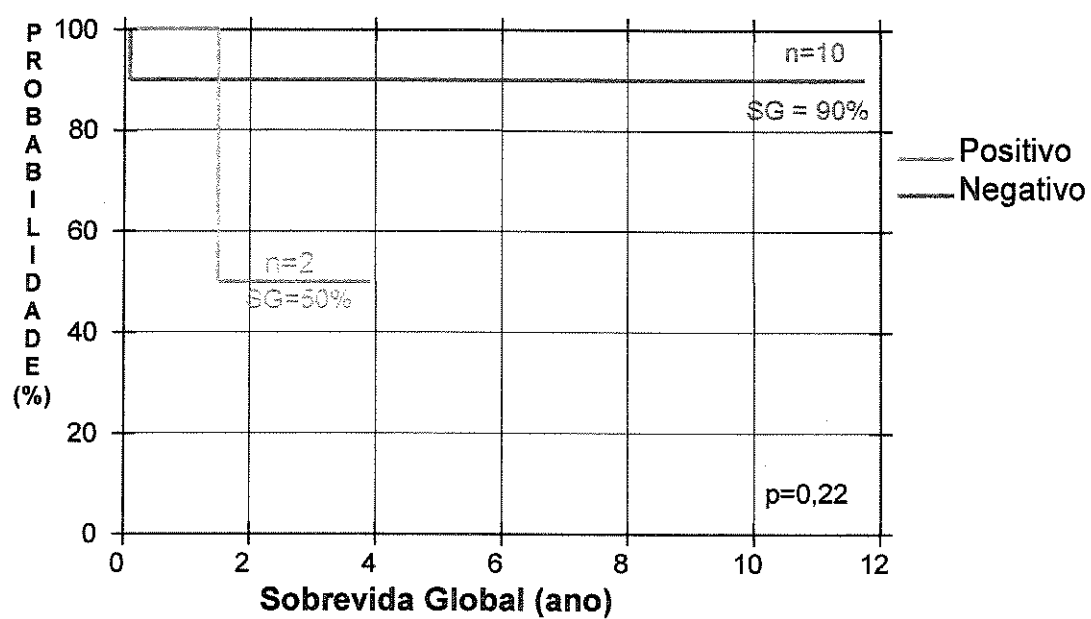


FIGURA 31- Sobrevida Global segundo a expressão do Ki-67 no momento da cirurgia nos pacientes com hepatoblastoma

A demonstração comparativa da expressão do marcador Ki-67 avaliada antes da quimioterapia (momento da biópsia diagnóstica) e após 4 ciclos (momento da ressecção cirúrgica do tumor) está contida na Figura 32. Vê-se expressiva negatização deste marcador, com a quimioterapia utilizada.

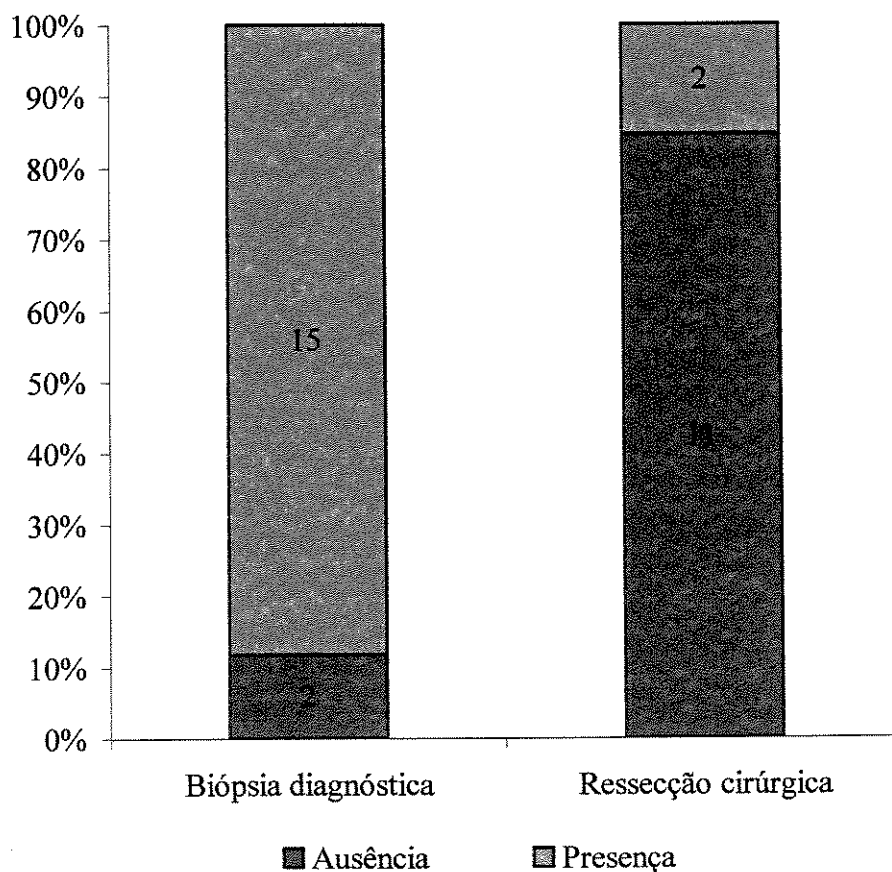


FIGURA 32- Distribuição de freqüência dos pacientes de acordo com a ausência ou presença da expressão do Ki-67 no material retirado da biópsia ao diagnóstico e na ressecção cirúrgica do tumor

A análise por imuno-histoquímica da β -Catenina, no momento do diagnóstico, foi realizada em 17 casos. Destes, 10 obtiveram resultados positivos para este marcador (58,8%). Em 7 casos não houve expressão da β -Catenina. Os pacientes com resultado positivo (n=10) apresentaram sobrevida global em 8 anos de acompanhamento de 60%,

enquanto aqueles casos com resultados negativos da β -Catenina ($n=7$) ao diagnóstico, apresentaram sobrevida global em 12 anos de 57,1% (Figura 33). Não houve diferença estatisticamente significativa da sobrevida global destes pacientes ($p=0,94$).

A análise imuno-histoquímica da β -Catenina, na peça da ressecção cirúrgica, foi realizada em 16 casos. Em apenas dois, o resultado foi negativo (casos nº 11 e 19). No caso nº 11, cujo subtipo histológico era fetal/embrionário, não possuíamos o resultado da expressão β -Catenina ao diagnóstico. Este paciente faleceu por infecção, na 4ª semana pós-operatória.

No outro caso com resultado negativo da β -Catenina no momento da cirurgia programada, o tumor era de histologia fetal puro. O paciente está vivo, em remissão contínua há 34 meses (caso nº 19). Os 13 casos restantes, no momento da cirurgia programada, apresentaram resultado positivo da β -Catenina. A sobrevida global em 12 anos foi de 76,9% (Figura 34). Nesta ocasião, também não houve diferença da sobrevida livre de eventos, de acordo com os resultados positivo ou negativo da β -Catenina ($p = 0,36$).

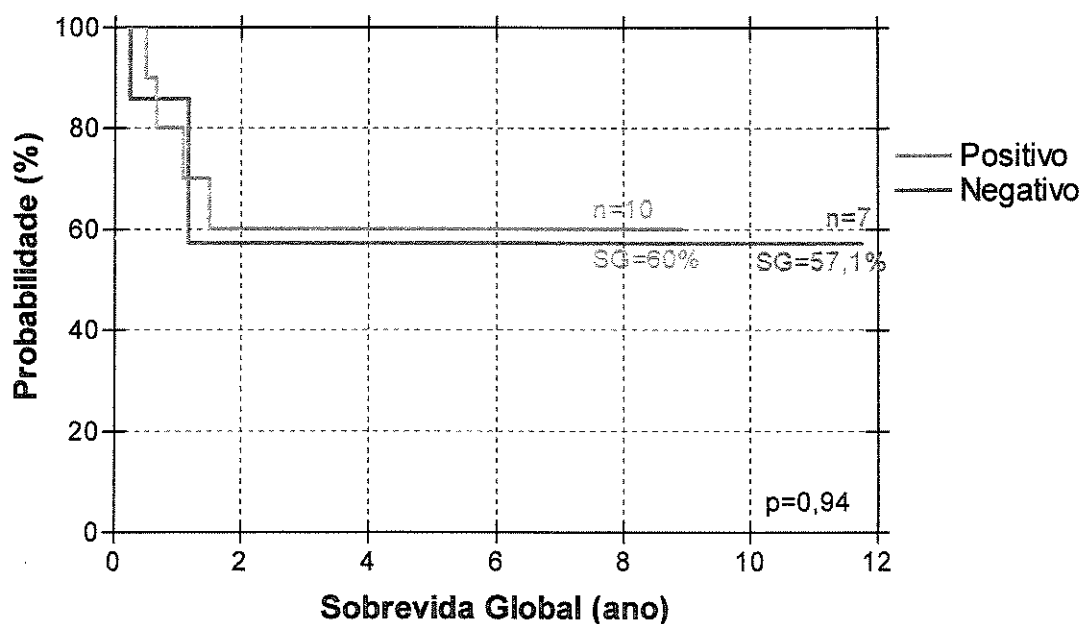


FIGURA 33- Sobrevida Global segundo a expressão da β -catenina no momento da biópsia diagnóstica nos pacientes com hepatoblastoma

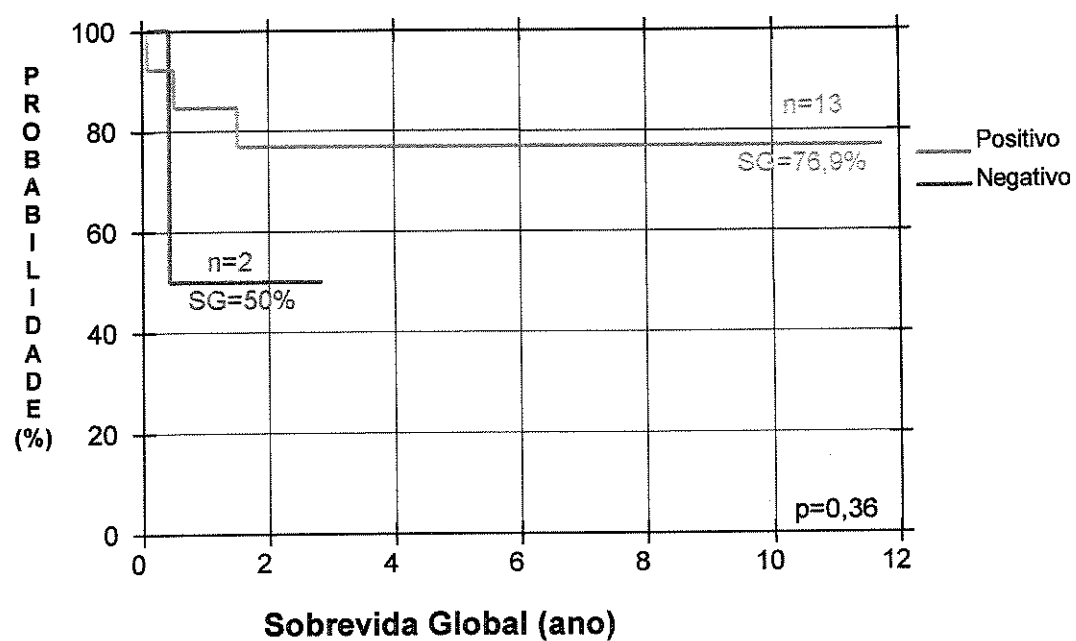


FIGURA 34- Sobrevida Global segundo a expressão da β -catenina no momento da cirurgia nos pacientes com hepatoblastoma

A variação da expressão da β -Catenina ao diagnóstico após o 4º ciclo de quimioterapia, está contida na Figura 35. Para a β -Catenina, nota-se discreto aumento da expressão deste marcador, após a quimioterapia utilizada .

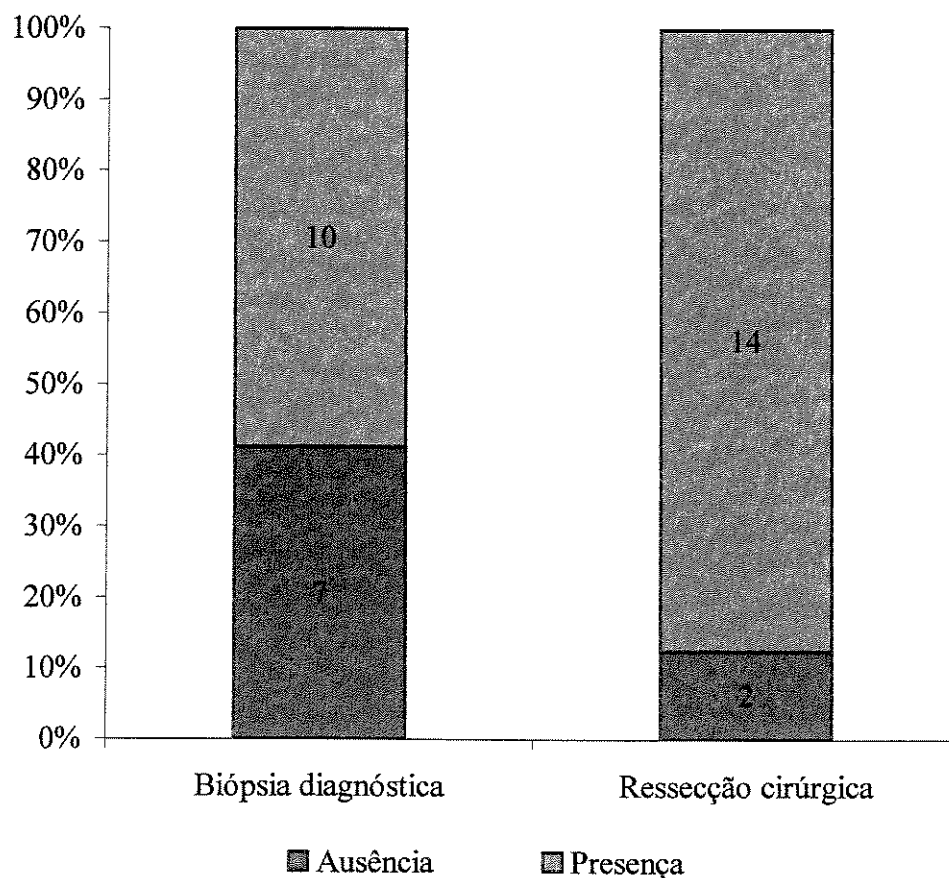


FIGURA 35- Distribuição da frequência dos pacientes portadores de hepatoblastoma de acordo com a ausência ou presença da expressão da β -Catenina no material retirado na biópsia ao diagnóstico e na ressecção cirúrgica do tumor

A glicoproteína P (GpP) foi avaliada no momento do diagnóstico pelo método de imuno-histoquímica em 17 casos , com resultados positivos em dois (casos n^{os} 16 e 18). Estes dois pacientes mantiveram sobrevida global em 4 anos de 100% , sendo o tumor de um deles de histologia fetal/embrionário (caso n^o 16) e do outro, do subtipo histológico fetal puro (caso n^o 18). Quinze pacientes apresentaram resultado negativo da GpP ao diagnóstico , com sobrevida global em 12 anos de 53,3% (Figura 36).

Na peça cirúrgica, 16 casos foram analisados quanto à expressão da GpP. Dez deles tiveram resultado negativo, com sobrevida global de 70% em 12 anos. Cinco pacientes expressaram positividade da GpP no momento da cirurgia, sendo que em dois deles (casos n^{os} 16 e 18) a GpP também era positiva ao diagnóstico, estes dois pacientes permanecem vivos e sem doença por período de acompanhamento de 47 e 35 meses. A sobrevida global para estes 5 pacientes foi de 80% em 9 anos (Figura 37).

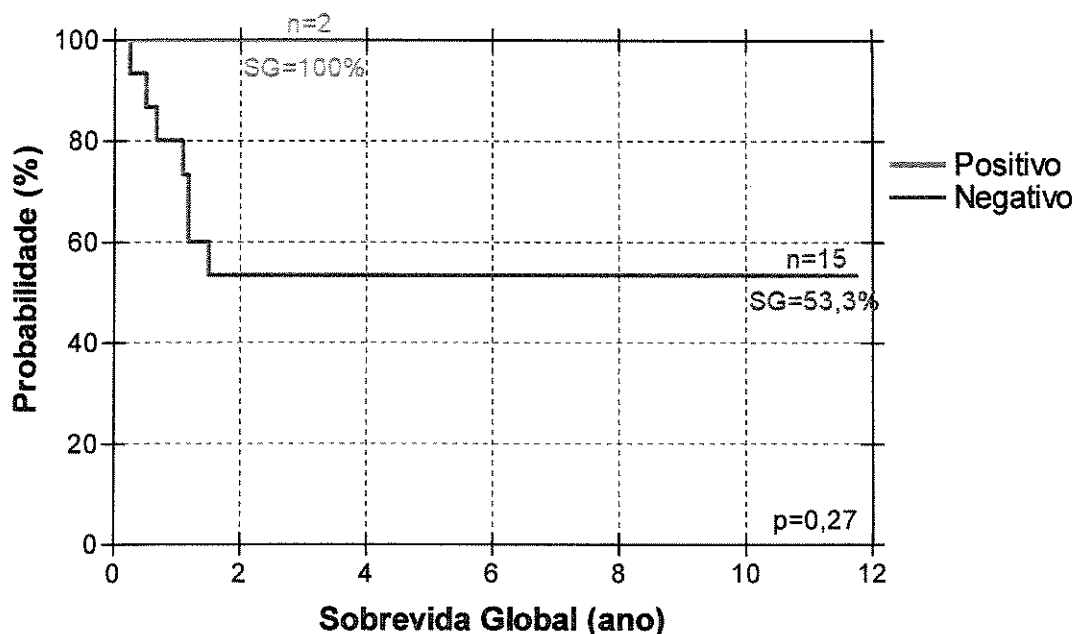


FIGURA 36- Sobrevida Global segundo a expressão da Glicoproteína P (GpP) no momento da biópsia diagnóstica nos pacientes com hepatoblastoma

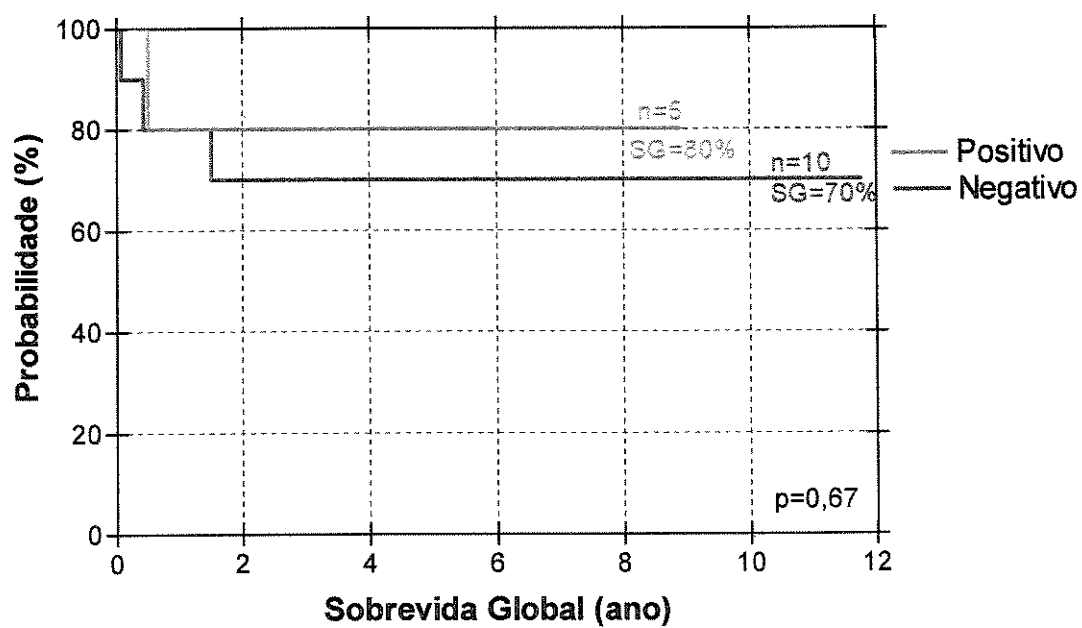


FIGURA 37- Sobrevida Global segundo a expressão da Glicoproteína P (GpP) no momento da cirurgia nos pacientes com hepatoblastoma

Um discreto aumento da expressão da glicoproteína P pode ser avaliada na Figura 38, após os 4 ciclos de quimioterapia (momento da ressecção cirúrgica do tumor).

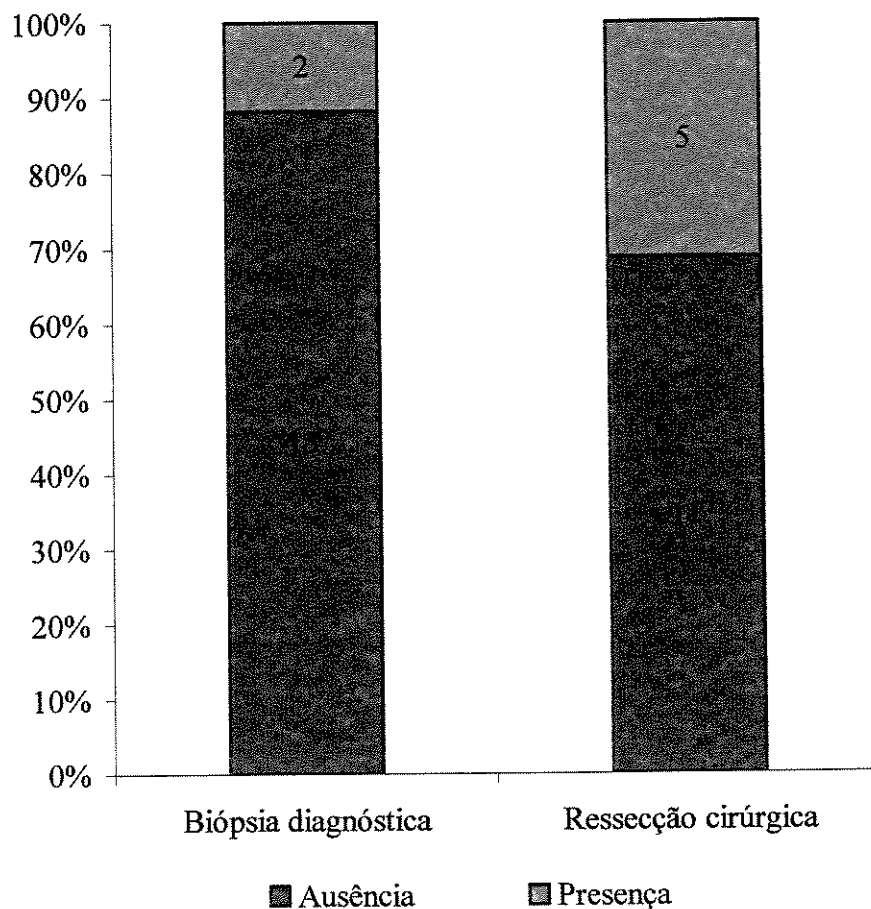


FIGURA 38- Distribuição de frequência dos pacientes de acordo com a ausência ou presença da expressão da GpP no material retirado na biópsia diagnóstica e na ressecção cirúrgica do tumor dos pacientes portadores de hepatoblastoma

A expressão do c-erb-B2 foi avaliada no momento da biópsia diagnóstica em 14 pacientes com hepatoblastoma. Oito deles apresentavam resultado positivo, com sobrevida global em 8 anos de 87,5%. Em seis casos, a análise imuno-histoquímica do c-erb-B2 foi negativa ao diagnóstico. A sobrevida global destes pacientes com c-erb-B2 negativo, em 12 anos de seguimento foi de somente 33,3% (Figura 39). Para este marcador, houve diferença estatística significativa quanto à sobrevida global ($p = 0,02$).

A análise do c-erb-B2 na peça cirúrgica foi realizada em 14 casos. Onze deles apresentaram resultado positivo. A sobrevida global destes últimos pacientes, foi de 72,7% em 12 anos de seguimento. Dois casos apresentaram resultado negativo do c-erb-B2 no momento da cirurgia, com sobrevida global em 8 anos de 100%. Não houve diferença estatística na sobrevida global com relação à positividade do c-erb-B2 no momento da ressecção cirúrgica ($p = 0,44$).

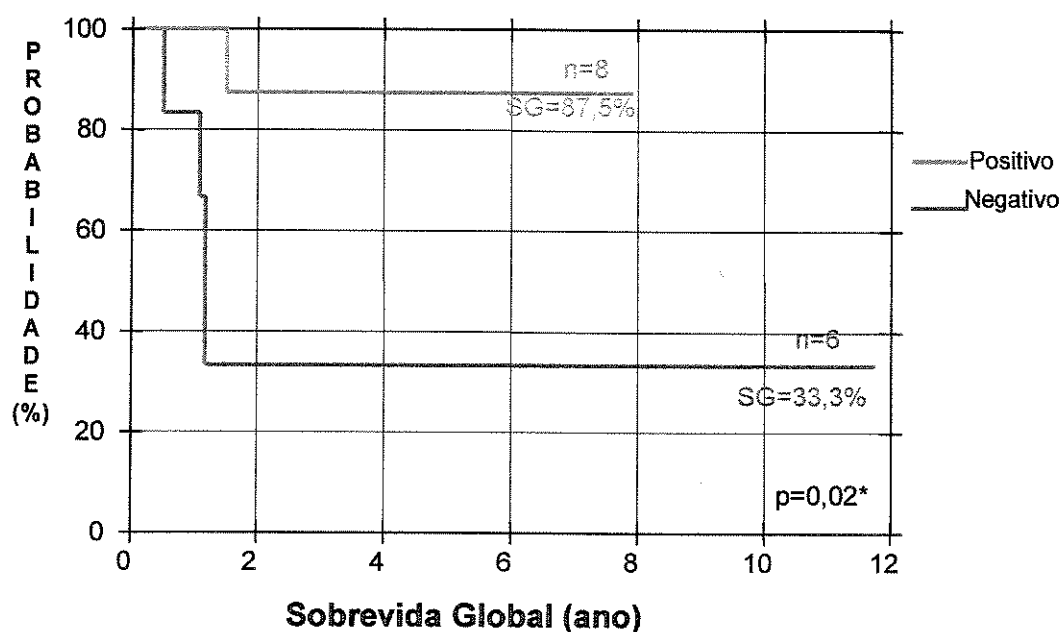


FIGURA 39- Sobrevida Global segundo a expressão do C-erb-B2 no momento da biópsia diagnóstica nos pacientes com hepatoblastoma

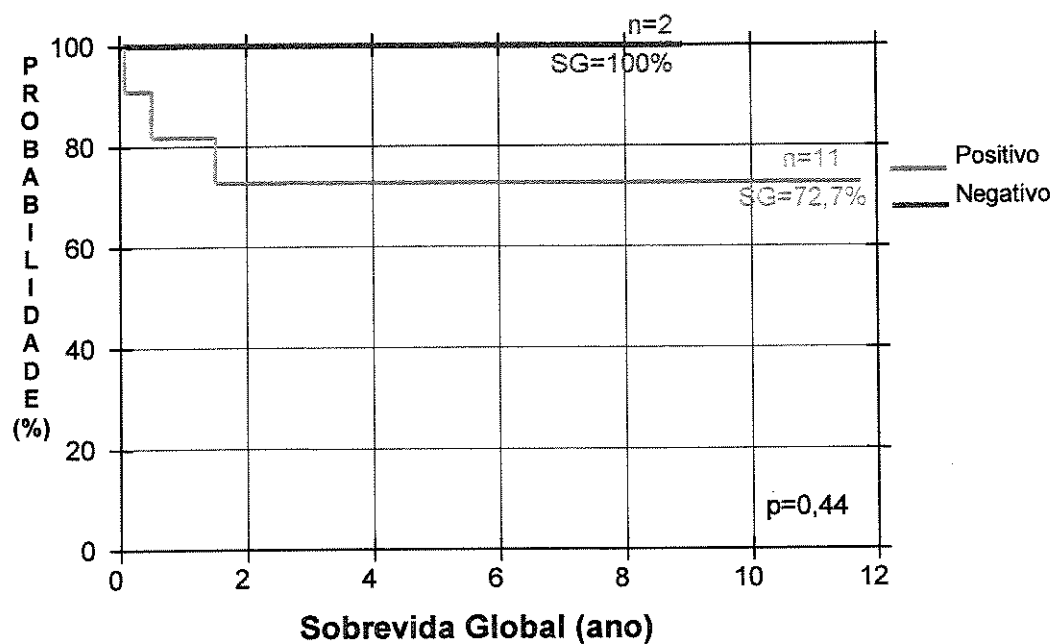


FIGURA 40- Sobrevida Global segundo a expressão do C-erb-B2 no momento da cirurgia nos pacientes com hepatoblastoma

O discreto aumento da negatividade do marcador c-erb-B2 após 4 ciclos de quimioterapia (momento da ressecção cirúrgica) pode ser visualizado na Figura 41.

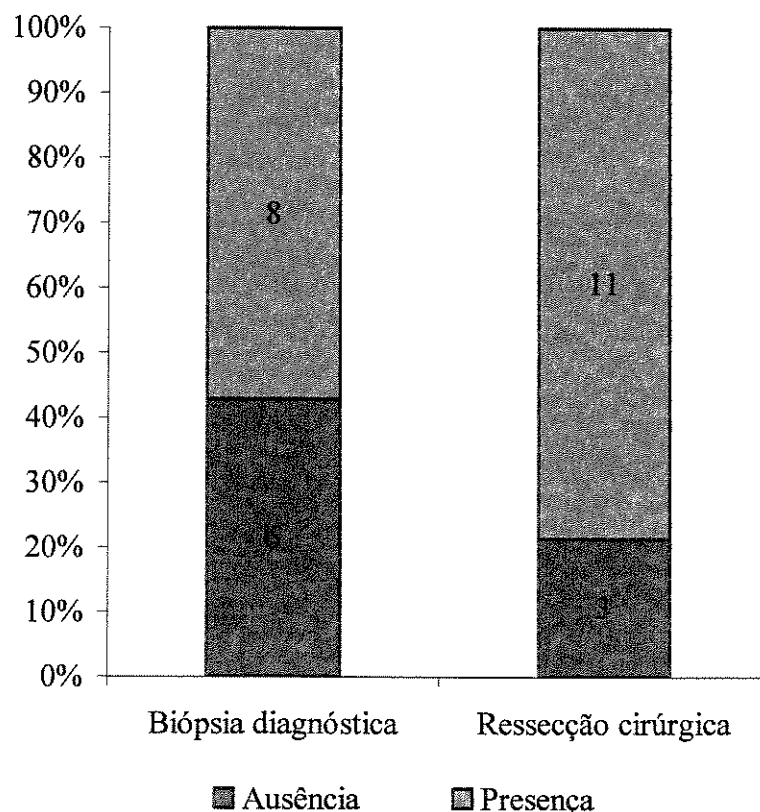


FIGURA 41- Distribuição de frequência dos pacientes de acordo com a ausência ou presença da expressão do c-erb-B2 no material retirado na biópsia diagnóstica e na ressecção cirúrgica do tumor dos pacientes portadores de hepatoblastoma

A análise do p53 por imuno-histoquímica foi realizada no momento da biópsia diagnóstica em 17 pacientes, e apenas um deles (caso nº 13) apresentou resultado positivo. Mais recentemente e , com material fresco congelado à -90°C , nosso laboratório de citogenética molecular introduziu a técnica de FISH. A expressão gênica do p53 foi analisada pelo método de FISH em 8 casos (casos nºs 2, 4, 7, 8, 9, 12, 13 e 15), com resultados positivos em cinco casos (casos nºs 2, 7, 9, 12 e 13 e Figura 44). A expressão do

p53 por imuno-histoquímica e pela técnica de FISH foi detectada no caso nº 13. O subtipo histológico do tumor desta paciente era fetal/embrionário, e a paciente está viva, em remissão clínica e laboratorial há 65 meses. Quatro outros casos apresentaram expressão do p53 pela técnica de FISH, não confirmada pela técnica de imuno-histoquímica (casos nºs 2, 7, 9 e 12). Destes 4 casos, 3 possuíam tumor do subtipo histológico fetal puro (casos nºs 2, 7 e 12) e apenas um está vivo e sem doença há 107 meses (caso nº 7). Os três casos com resultados negativos do p53 pela técnica de FISH (casos nºs 4, 8 e 15) também o foram pela técnica de imuno-histoquímica. Dois deles (casos nºs 4 e 8) tinham tumor do subtipo histológico fetal puro e estão vivos, em remissão há 141 e 95 meses.

A sobrevida global para os pacientes com p53 negativo ao diagnóstico, foi de 56,2% em 12 anos de seguimento (Figura 42). Na peça cirúrgica, o exame de imuno-histoquímica para p53 foi realizado em 16 pacientes, com apenas um resultado positivo (caso nº 15), cujo tumor era do subtipo histológico fetal/embrionário e desenvolveu resistência à quimioterapia, falecendo por progressão de tumor. Os demais casos com resultado negativo do p53 na peça cirúrgica, apresentaram sobrevida global em 12 anos de 78,6% (Figura 43).

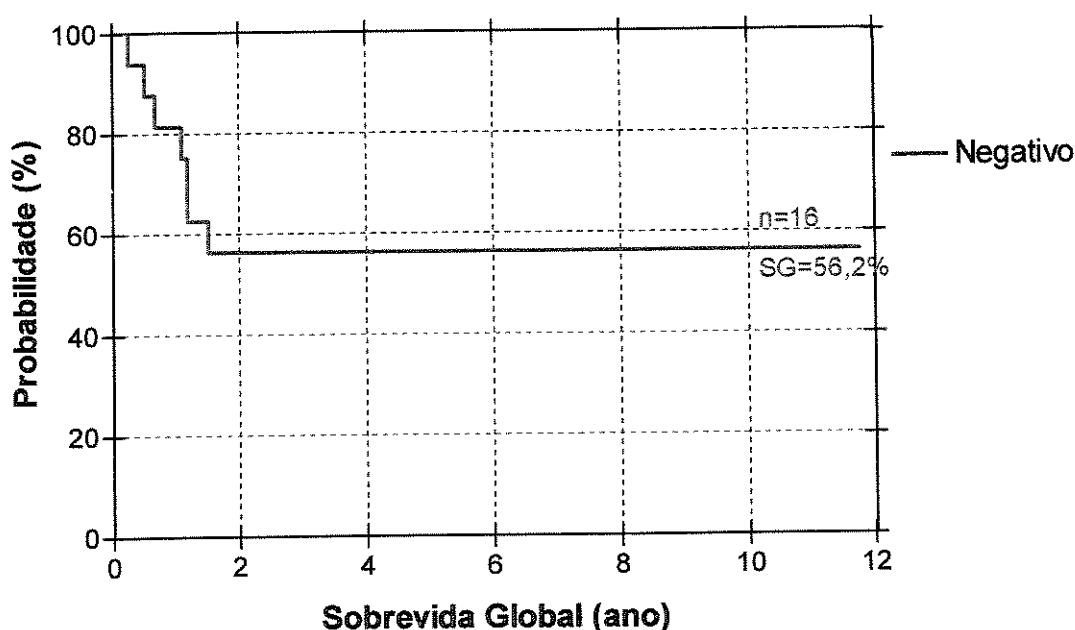


FIGURA 42- Sobrevida Global segundo a expressão do p53 no momento da biópsia diagnóstica nos pacientes com hepatoblastoma

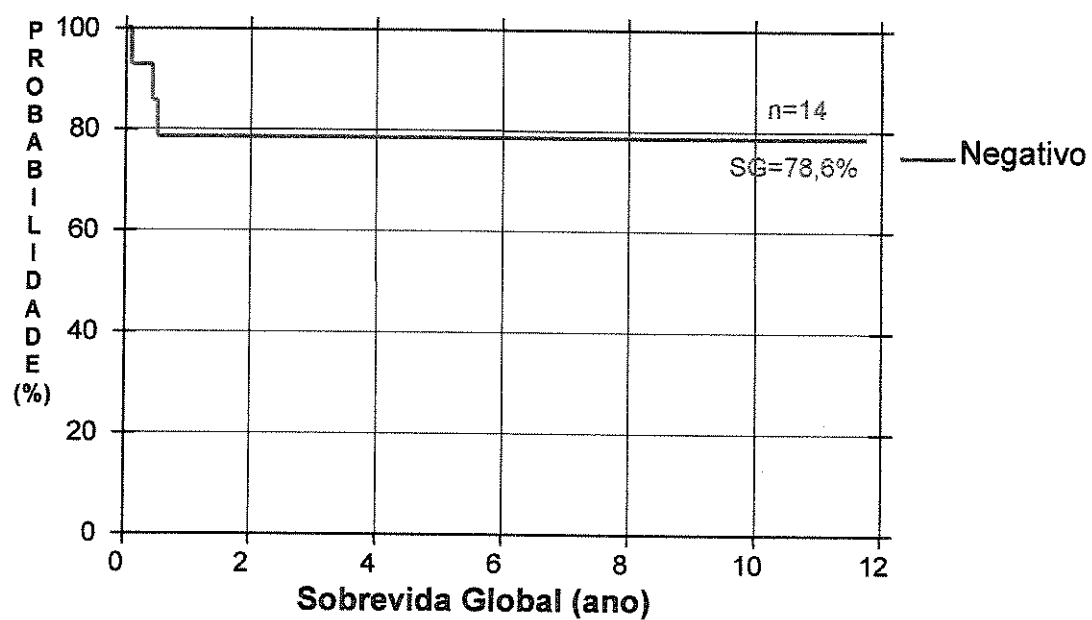


FIGURA 43- Sobrevida Global segundo a expressão do p53 no momento da cirurgia nos pacientes com hepatoblastoma

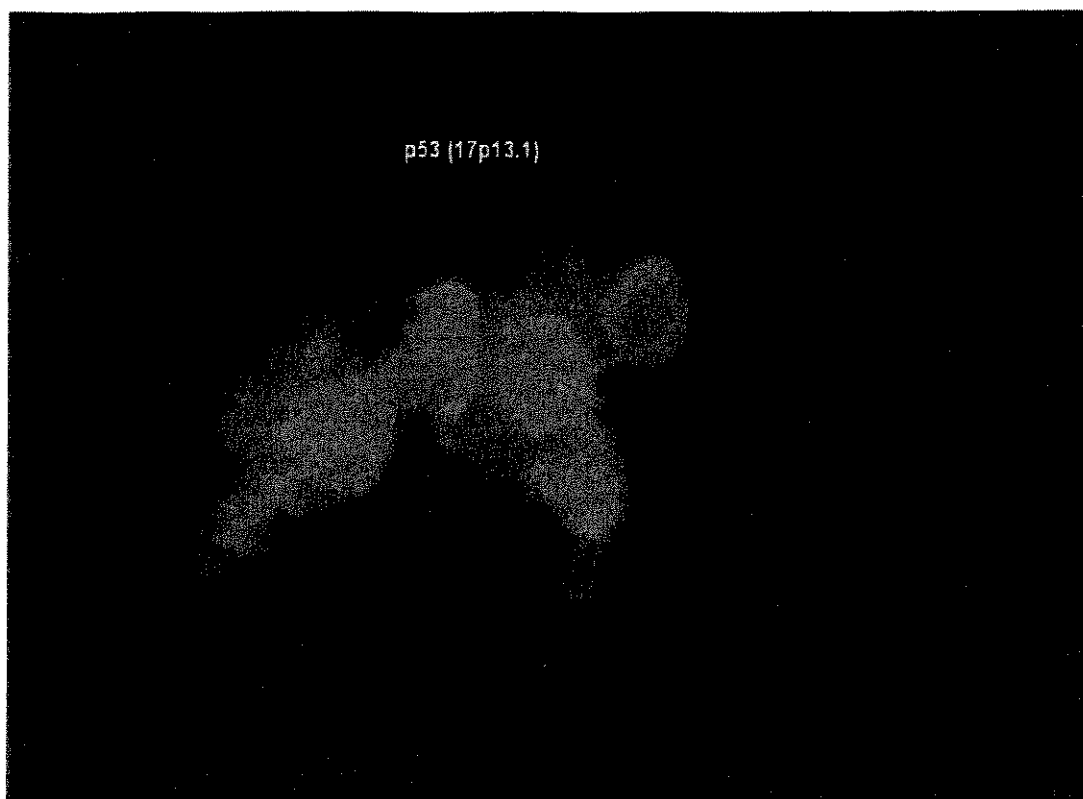


FIGURA 44- Resultado positivo da expressão do p53 pela técnica de FISH

A Figura 45 apresenta, comparativamente, as mesmas cifras de inexpressividade do p53, tanto na biópsia diagnóstica, quanto na peça da ressecção do tumor.

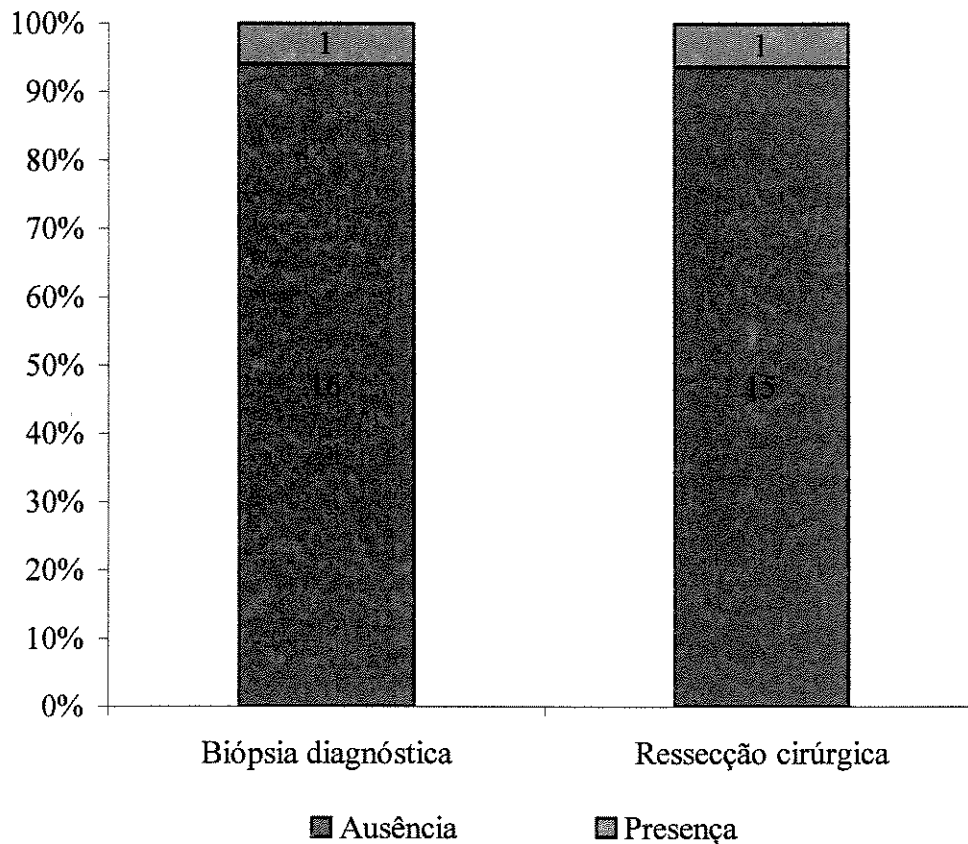


FIGURA 45- Distribuição de freqüência dos pacientes de acordo com a ausência ou presença da expressão do p53 no material retirado na biópsia diagnóstica e na ressecção cirúrgica dos pacientes portadores de hepatoblastoma

A análise global das expressões da β -Catenina , do PCNA , do Ki-67 , do p53 , do c-erb-B2 e da GpP , de acordo com os subtipos histológicos (Tabela13) e os grupos de estadiamento (Tabela 7) não evidenciou uma associação entre estes parâmetros na casuística estudada . Entretanto , a positividade da expressão do c-erb-B2 , quer ao diagnóstico , mas principalmente no momento cirúrgico , estava mais associada ao subtipo histológico fetal puro . A positividade da β -Catenina ao diagnóstico foi igual entre os subtipos histológicos fetal puro e fetal/embrionário.

TABELA 13- RESULTADO GERAL DOS MARCADORES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA AVALIADOS NO MOMENTO DA BIÓPSIA DIAGNÓSTICA E NO MOMENTO DA RESECCÃO CIRÚRGICA DO TUMOR

Nº	β - catenina		PCNA (%)		Ki - 67 (%)			p53			c - erb - B2			GpP		SUBTIPO HISTOPATOLÓGICO	CONDIÇÃO ATUAL*	TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA (mês)
	B	c	b	c	b	c	b	c	b	c	b	c	b	c	b			
1	-	pos	-	34,0	-	neg	-	neg	-	neg	-	pos	-	neg	-	Fetal/Embrionário	OS	1
2	Pos	-	20,0	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	Fetal	OT	13
3	Neg	-	-	-	7,0	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	Misto Teratóide	OS	3
4	Neg	pos	24,8	neg	8,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	-	Fetal	RCC	141
5	Pos	-	-	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	-	-	-	-	Fetal/Embrionário	OT	8
6	-	pos	-	22,8	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	Fetal/Embrionário	Desconhecida	-
7	Pos	pos	34,4	29,4	22,4	-	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	-	Fetal	RCC	107
8	Pos	pos	35,8	7,0	29,4	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	-	Fetal	RCC	95
9	Pos	pos	52,2	43,4	33,2	-	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	-	Fetal/Embrionário	OS	6
10	Pos	pos	-	27,8	7,0	neg	neg	neg	neg	neg	-	pos	neg	neg	-	Fetal	RCC	78
11	-	neg	-	-	-	-	-	neg	-	neg	-	-	-	neg	-	Fetal/Embrionário	OS	5
12	Neg	-	29,6	-	28,0	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	Fetal	OT	14
13	Neg	pos	30,0	18,0	22,4	neg	pos	neg	pos	pos	pos	-	neg	neg	-	Fetal/Embrionário	RCC	65
14	Neg	pos	75,2	9,0	22,8	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	pos	-	Fetal	RCC	55
15	Pos	pos	27,0	90,0	23,0	40,8	neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	-	Fetal/Embrionário	OT	18
16	Pos	pos	47,2	8,2	35,0	45,6	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	-	Fetal/Embrionário	RCC	47
17	-	pos	-	4,8	-	neg	-	neg	-	neg	-	pos	-	neg	-	Fetal	RCC	45
18	Pos	pos	21,0	23,0	17,0	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	-	Fetal	RCC	35
19	Pos	neg	40,0	17,0	32,0	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	-	Fetal	RCC	34
20	Neg	pos	22,0	18,0	20,4	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	-	Fetal	RCC	32
21	Neg	-	15,8	-	43,6	-	neg	-	neg	-	neg	-	neg	-	-	Macrotrabecular	OT	14

b Biópsia diagnóstica
 c Cirurgia
 pos Positivo
 neg Negativo

*
 OT
 OS
 RCC

Tempo de sobrevivência do diagnóstico até abril/2003
 Óbito por progressão de tumor refratário
 Óbito por sepse decorrente da neutropenia pós- quimioterapia
 Vivo, em remissão clínica completa

5 - DISCUSSÃO

Características Clínicas

Embora o hepatoblastoma seja uma doença rara , as casuísticas publicadas na literatura referem-se a grandes serviços de oncologia , em estudos multicêntricos, com a informação da inclusão de 17 casos novos de hepatoblastoma por ano ,no grupo cooperativo alemão (FUCHS et al., 2002) ,de 2 a 3 casos/ano no Canadá (EHRlich et al., 1997), de 34 casos/ano no *Children's Cancer Group* (ORTEGA et al.,1994), de 19 casos/ano no *Pediatric Oncology Group* (DOUGLASS et al., 1993) e de 38 casos/ano no grupo SIOPEL (PERILONGO et al., 2000). A presente casuística, de 21 casos em Instituição única, compara-se àquelas dos grandes centros internacionais, sendo de significativa relevância.

Na casuística apresentada neste estudo, houve uma relação de frequência quanto ao sexo, de 2:1 (feminino:masculino), proporção esta invertida em relação à referida na literatura . Os estudos de hepatoblastoma do *Children's Cancer Study Group (CCG)* e do *Pediatric Oncology Group (POG)*, publicados por ORTEGA et al. (1991) e por KING et al. (1991), respectivamente, evidenciaram em uma casuística de 46 pacientes, significativa preponderância do sexo masculino, com uma relação de 3:1 (masculino : feminino).

Na população americana, esta prevalência do hepatoblastoma em meninos é comparável à população pediátrica alemã ,com uma relação de ocorrência do tumor de 2,4:1 (SCHMIDT et al. , 1985 e , FUCHS et al. , 2002) e de 1,5:1 referentes aos dados do grupo cooperativo alemão HB-89 (von SCHWEINITZ et al.,1994) . No Canadá , a distribuição de frequência do hepatoblastoma de acordo com o sexo é de 2,5:1 , com predomínio no sexo masculino (EHRlich et al , 1997). Registros de hepatoblastoma de 91 centros distribuídos em 30 países , no estudo cooperativo SIOPEL 1 , também mostraram 97 meninos entre 154 casos relatados , o que confere a proporção de 1,7:1 (BROWN et al. , 2000).

Com relação à maior frequência do sexo feminino observada no presente estudo, não encontramos explicação para esta variável epidemiológica em nosso país, principalmente se considerarmos que todos os casos consecutivos desta patologia, ingressados no Centro Infantil Boldrini no período de agosto de 1984 até dezembro de 2001, foram incluídos no estudo.

Quanto à característica racial , a presente casuística revelou o predomínio do hepatoblastoma na raça branca, pois, de 21 pacientes , somente 1 era pardo . É preciso salientar que o último censo do IBGE de 2000 mostrou menor prevalência da população negra (1 667 745 habitantes negros e 8 480 870 pardos) na região sudeste do Brasil (26 067 368 de habitantes) em relação à população branca . Na região de Campinas , a taxa da população branca é de 77% , enquanto a dos negros é da ordem de 22 %. Não encontramos referência quanto à distribuição deste tumor, por raça, na literatura consultada até o momento (junho de 2003).

No que concerne à faixa etária de acometimento do hepatoblastoma , 42,8% dos casos do presente estudo encontravam-se, ao diagnóstico , com idades entre 6 e 36 meses , semelhantes às registradas na literatura (**BROWN et al.,2000**).

Os principais sintomas apresentados pelos pacientes foram em ordem decrescente , aumento de volume abdominal e/ou massa abdominal palpável pela mãe ou pelo médico (90%) , hipo-atividade (30%) e anorexia (10%) .A presença do aumento do volume abdominal e massa palpável em hipocôndrio direito , características da sintomatologia dos pacientes com doença localizada, foram os achados mais freqüentes em 95,2% dos pacientes, pertencentes aos grupos I , II e III (PRETEXT/SIOPEL). Em nenhum deles houve queixa de perda de peso , vômitos ou dor abdominal , sintomas estes mais freqüentes em estádios avançados da doença. Os sintomas mencionados por **PERILONGO et al. (1999)** , seguem perfil semelhante , sendo a massa palpável o mais relevante.

Contrariamente ao conceito, que se pressupõe na pediatria geral, de que o câncer se associa a perda de peso, não houve a ocorrência da desnutrição em nossos pacientes , quer secundária ao tumor ao diagnóstico , quer como doença associada. Nenhum paciente estava desnutrido no momento do diagnóstico. A maioria deles (47,6%) pertencia aos percentis 25-50 da curva de desenvolvimento pondero-estatural de **MARCONDES et al. (1982)**.

A suspeita diagnóstica do tumor hepático, foi feita pelo pediatra cuidador, em um tempo médio, de história clínica, de 20 dias. Este tempo, relativamente curto, justificou a maior prevalência da doença localizada , sendo que 52,4% dos pacientes pertenciam ao

grupo II, e somente um paciente (4,8%) foi classificado no grupo IV (doença avançada). Foi maior a porcentagem de diagnóstico precoce feito pelos profissionais de saúde em nosso meio , comparativamente aos registros obtidos pelo grupo cooperativo internacional SIOPEL 1, que mostraram maior incidência de hepatoblastoma no grupo II, na população estudada (34%) . Esta publicação diz respeito a 154 crianças oriundas de 30 países (BROWN et al., 2000).

Sistema de Estadiamento

Até 1990 , os sistemas para estadiamento dos tumores hepáticos em crianças, incluindo o hepatoblastoma , eram baseados nos achados cirúrgicos .Essa abordagem não contemplava a real delimitação do acometimento pelo tumor ao diagnóstico , momento em que a quimioterapia, é na maior parte dos casos, a única opção terapêutica .

O sistema de estadiamento pós-operatório , também chamado de Classificação TNM , desenvolvido por Pierre Denoix entre 1943 e 1952 , foi adotado pela *International Union Against Cancer* em 1958 e modificado pelo grupo Japonês em 1983 (MORITA et al. , 1983). Posterior simplificação deste sistema foi implementada pelo *Children's Cancer Study Group (CCSG)* em 1991 por ORTEGA et al., e pelo *Pediatric Oncology Group (POG)* ,em 1993, por DOUGLASS et al. A simplificação, também centrada nos achados cirúrgicos , aboliu o conceito da Classificação TNM , e estabeleceu 4 estadios:

Estadio I : tumor totalmente ressecado ;

Estadio II : doença residual microscópica intra-hepática ou extra-hepática ;

Estadio III : doença residual macroscópica , com tumor primário completa ou incompletamente ressecado , e/ou gânglios positivos e/ou ruptura ;

Estadio IV : doença metastática, com ou sem ressecção completa do tumor primário.

Análise retrospectiva de 72 pacientes com hepatoblastoma, tratados pelo grupo alemão de acordo com o *German Pediatric Liver Tumor Study Group HB 89* , demonstrou que o sistema original de classificação TNM , assim como a modificação da classificação proposta pelo CCSG/POG tinham , igualmente , valor preditivo significante para a

sobrevida dos pacientes ($p=0,0001$ e $p=0,0009$, respectivamente). Entretanto, ao ser utilizada a classificação TNM modificada pelo Grupo Japonês , os resultados mostraram baixo valor preditivo ($p=0,016$).

Nesta última década, a Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica propôs outro sistema de estadiamento denominado de PRETEXT/SIOPEL, baseado nos exames de imagem pré-operatórios (MAC KINLAY et al. , 1992). Esta estratégia, além de padronizar o grau de acometimento do tumor, ao diagnóstico , também permitiu avaliar a resposta à quimioterapia. Entre os parâmetros utilizados para avaliação da extensão inicial da doença , foram especificados o envolvimento da veia cava , veia porta , veias hepáticas , a extensão extra-hepática do tumor, e também a presença de metástases à distância.

Seis pacientes apresentavam-se, ao diagnóstico, com envolvimento da veia porta e/ou veias hepáticas e/ou veia cava (casos nº 7, 8, 9, 10, 15 e 19). Dois destes pacientes faleceram , um por sepse pós-operatória e um por progressão de doença refratária à quimioterapia (casos nº9 e 15, respectivamente). Ambos eram do subtipo histológico fetal/ embrionário. O caso nº7 , pertencente ao grupo do subtipo fetal puro, apresentou recidiva pulmonar isolada , três meses após o término da primeira terapia. Esta criança está viva , e em segunda remissão há 8,9 anos. Aparentemente , o acometimento destes vasos sangüíneos da região hepática não teve impacto desfavorável no prognóstico . Estes achados são semelhantes àqueles relatados pelo grupo SIOPEL (PERILONGO et al., 2000 ; BROWN et al., 2000) , em que o envolvimento extra hepático do tumor , restrito aos vasos do pedículo hepático , não acarretou pior prognóstico.

O contrário foi observado nos doentes com metástases à distância. Três pacientes apresentavam-se com metástases pulmonares ,ao diagnóstico (casos nº 5,6 e 12). Dois deles faleceram por progressão da doença, refratária à quimioterapia , sendo um deles do subtipo histológico fetal puro (caso nº12).O terceiro paciente pertencia ao subtipo histológico fetal/embrionário. Apresentou recidiva da doença , sendo submetido a um segundo esquema terapêutico , realizando posterior transplante hepático em outro Serviço. Foi perdido de seguimento após 3 meses , sem evidência de doença (caso nº6).

Na experiência do grupo SIOPEL , a ocorrência de metástase pulmonar ao diagnóstico foi fator de maior relevância na redução da sobrevida destes pacientes (PERILONGO et al., 2000). Entretanto, sob o nosso ponto de vista, é difícil imputar exclusivamente ao acometimento pulmonar a relevância prognóstica desfavorável , sem considerar o subtipo histológico e , possivelmente , o grupo clínico.

Esperávamos encontrar menores taxas de sobrevida nos estadios mais avançados da doença. No grupo I , a sobrevida livre de eventos foi de 75% em 6 anos. No grupo II a sobrevida livre de eventos foi de 40% em 12 anos e, no grupo III a taxa da sobrevida livre de eventos foi de 60% em 6 anos. Embora houvesse decréscimo das taxas da sobrevida livre de eventos nos grupos mais avançados, a diferença não foi significativa , com relação aos grupos de estadiamento ($p= 0,64$), possivelmente em decorrência do pequeno número da amostra. A única criança pertencente ao grupo IV faleceu por doença progressiva , refratária à quimioterapia . Esta apresentava o tumor do subtipo histológico macrotrabecular .

Resultados do protocolo SIOPEL 2 , apresentados por PERILONGO et al., *Proceedings da ASCO 2002* , demonstraram uma taxa de sobrevida livre de eventos em 3 anos de 89% para o grupo de baixo risco (PRETEXT grupos I, II e III) , e de 48% para os pacientes de alto risco (PRETEXT grupo IV).

O desaparecimento dos achados anormais em exames de imagem , associado aos níveis normais da α -feto proteína sérica , é critério para a definição de resposta completa à quimioterapia utilizada. Qualquer nível de redução do volume do tumor , com decréscimo maior que 1 *log* nos níveis da α -feto proteína sérica, é critério para definição de resposta parcial à quimioterapia. A doença é classificada como estável na ausência de alteração no volume do tumor , e também na ausência de mudança ou queda de menos de 1 *log* dos níveis da α -feto proteína sérica. Finalmente, a progressão da doença é definida pelo aumento do volume do tumor e/ou das concentrações da α -feto proteína sérica (3 resultados / dosagem semanal), mesmo sem evidência clínica ou radiológica de progressão. Estes critérios são adotados desde 1991 pelo grupo cooperativo que trata de tumor hepático , pertencente à Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (SIOPEL) desde 1991.

Quando se analisou o prognóstico dos pacientes , de acordo com o grau de resposta à quimioterapia inicial , baseada na imagem , na diminuição dos níveis séricos da α -feto proteína e ressecabilidade cirúrgica , se verificou que dos 21 pacientes somente 5 não reduziram de maneira significativa o tumor nos exames de imagem , sem diminuição da α -feto proteína sérica , com progressão do tumor em poucos meses (casos nº 2, 5,12,15 e 21) .

Os demais pacientes tiveram resposta completa ou parcial , mesmo aqueles com restos microscópios do tumor no momento cirúrgico (casos nº 10, 14,18 e 20), estão vivos e livres de doença.

O valor prognóstico desta resposta inicial à quimioterapia , antes do procedimento da ressecção cirúrgica, foi estabelecido na literatura (ORTEGA et al.,1991; KING et al., 1991;DOUGLASS et al.,1993 ; ORTEGA et al., 1994), fato que ressalta a importância do sistema de estadiamento PRETEXT/SIOPEL. Em nossa casuística 55% dos pacientes estão vivos , sem evidência de doença , em um período de seguimento de 2,6 a 12 anos . Apenas 3 pacientes recidivaram . Um deles (caso nº 12) , do subtipo histológico fetal puro , faleceu por progressão de doença refratária à quimioterapia . O outro (caso nº7) apresentou recidiva isolada para pulmões , 3 meses após o termino de sua terapia . Este paciente pertencia ao subtipo histológico fetal puro , grupo III VP , com ressecção completa do tumor em fígado e de suas extensões para veias cava e porta , foi submetido à um segundo esquema terapêutico e está vivo , livre de doença , em 2ª remissão há 8,9 anos. O terceiro paciente , foi excluído (caso nº6) , por perda de seguimento após 3 meses da realização de transplante hepático em outro Serviço , em remissão .

Achados histopatológicos

Considerando que o Serviço próprio de Anatomia Patológica do Centro Infantil Boldrini foi implantado somente em 1998 , tornou-se necessária, para este estudo, a revisão dos diagnósticos histopatológicos feitos em diferentes Serviços de Patologia da cidade de Campinas .

Como o Centro Infantil Boldrini é Instituição participante do SIOPEL , grupo este coordenado pelo Prof. Dr. Giorgio Perilongo, Padova, Itália (perilongo@child.pedi.unipd.it), foi solicitado ,pelo mesmo, a revisão histopatológica dos casos de hepatoblastoma inscritos nos protocolos SIOPEL 1, 2 e 3 (de 1993 a 2001) , tendo sido realizada pelo Prof. Dr. Arthur Zimmerman (zimmerman@patho.unibe.ch).

No período anterior a este , consideramos, para um segundo parecer, aqueles emitidos pelos patologistas Profa. Dra. Cecília Escanhoela (UNICAMP) e Prof. Dr. Marcelo Alvarenga (PUCC/IPC/CAISM UNICAMP). O nível de concordância dos subtipos histológicos dos 21 casos foi de 100%.

A preponderância do subtipo histológico fetal puro foi encontrada neste estudo em 11 pacientes (52,4%). Na literatura , a freqüência da ocorrência deste subtipo histológico nos pacientes com hepatoblastoma é de 20% , enquanto que a do subtipo fetal/embrionário chega a 50% dos casos . Em nossa casuística , a freqüência deste último subtipo histológico foi de 38%. Não temos explicação para maior incidência do subtipo histológico fetal puro observada na presente amostra. Mais raros foram os subtipos macrotrabecular (4,8% dos nossos pacientes) e o misto teratóide (4,8%). Na literatura são citadas as freqüências do misto teratóide e do macrotrabecular, de 9% e 3% dos casos de hepatoblastoma , respectivamente (**CONRAN et al,1992 ; BROWN et al., 2000**).

A associação do padrão embrionário ao subtipo fetal , é citada na literatura , ocorrer em 50% dos casos . A presença do componente embrionário foi registrada em 8 pacientes e determinou queda significativa da taxa de sobrevida global em 12 anos , de 72,7% para 28,6% ($p=0,02$) . O subtipo fetal puro na presente casuística , mostrou-se variável independente de bom prognóstico. A correlação entre os achados histológicos e a sensibilidade à poliquimioterapia também foi enfatizada na literatura (**ORTEGA et.al, 1998 ; PERILONGO et al., 2000 ; BROWN et al., 2000 ; BROCK et al., 2002**) . Estes autores mostraram melhor resposta terapêutica nos pacientes com subtipo histológico fetal puro , quando comparados aos demais subtipos . Nas casuísticas deste autores , o subtipo preponderante foi o fetal/embrionário .Os resultados da terapêutica do hepatoblastoma para os autores mencionados relatam cifras de sobrevida global entre 60 e 75%, em 10 anos de seguimento.

Em apenas um caso, o padrão histológico foi do tipo macrotrabecular (caso nº21) , não responsivo à quimioterapia. Um paciente apresentou o subtipo misto teratóide (caso nº3) . Este último paciente faleceu em decorrência de sepse , durante episódio de neutropenia febril , no 3º mês de terapia.

O conhecimento do bom prognóstico associado ao subtipo histológico fetal fundamentou o embasamento recentemente feito por ROWLAND et al., 2002, para a delineação do atual protocolo terapêutico do CCG (Nº 9645), que preconiza exclusivamente cirurgia, como modalidade terapêutica ,para os tumores do subtipo fetal e no estadio I (totalmente ressecados ao diagnóstico).

Abordagem Terapêutica

O momento cirúrgico, programado para todos os pacientes com hepatoblastoma, reveste-se de grande importância. Deve o cirurgião abordar o tumor com menor tamanho, após a utilização da quimioterapia, objetivando melhor delimitação das margens, como também realizar a completa ressecabilidade . A cirurgia programada consiste na retirada do tumor em bloco , após o 4º ciclo de quimioterapia , conforme preconizado pelo grupo SIOPEL (BROWN et al., 2000).

Em nossa casuística , 2 pacientes foram operados ao diagnóstico e 3 tumores foram considerados irresssecáveis no momento cirúrgico . Os 16 pacientes restantes foram operados após o 4º ciclo de quimioterapia. Em nenhum caso houve ressecção incompleta do tumor (restos macroscópicos). Em 4 pacientes, as margens cirúrgicas estavam microscopicamente comprometidas pelo tumor (casos nº10,14,18 e 20). Estes 4 pacientes apresentavam tumor do subtipo histológico fetal puro , encontrando-se vivos, livres da doença, por um período de seguimento de 2,6 a 6,5 anos. A presença das margens cirúrgicas comprometidas pelo tumor não trouxe um prognóstico desfavorável . Após o ato cirúrgico , como previsto no protocolo SIOPEL , mais 2 ou 3 ciclos de quimioterapia foram administrados a todos os pacientes .

A recidiva local ocorreu em um único paciente (caso nº6). Neste caso, no momento da cirurgia da ressecção do tumor primário , as margens estavam livres . A histologia do tumor era fetal/embrionária, estando o paciente incluído no grupo II M . Após novo esquema de quimioterapia, o paciente apresentou nova remissão. Foi submetido a transplante hepático em outro Serviço e perdido de seguimento 3 meses após este procedimento , estando em remissão completa . Este caso (nº6) foi excluído de nossa análise , quando o objetivo foi o cálculo da sobrevida.

A não ressecabilidade cirúrgica, ocorrida em 3 pacientes (casos nº 2 , 3 e 21), decorreu da não resposta à quimioterapia em 2 deles , com posterior progressão do tumor (casos nº 2 e 21). No caso nº 3 ,a criança faleceu por sepse , antes da realização do procedimento cirúrgico.

O pós-operatório destes pacientes com hepatoblastoma , feito em terapia intensiva , ocorreu sem intercorrências em 16 deles. O caso nº9 faleceu por infecção grave na 2ª semana do pós-operatório , caracterizada pela presença de abscesso peri-hepático e necrose tubular renal , em exame de necrópsia , embora nenhum agente bacteriano tivesse sido isolado. O caso nº 11 evoluiu para óbito na 4ª semana do pós-operatório , em outro Serviço , com insuficiência hepática e sepse, também sem agente infeccioso isolado em culturas.

De 1984 até 1989 , foram registrados 3 pacientes com diagnóstico de hepatoblastoma no Centro Infantil Boldrini , tratados por esquemas terapêuticos diferentes do SIOPEL .Os casos nº 1 e 3 faleceram por sepse e o caso nº 2 apresentou tumor refratário à quimioterapia . A partir de 1991 , foram padronizados para estes pacientes com hepatoblastoma os protocolos terapêuticos da Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica , chamados de SIOPEL 1, 2 e 3 . A uniformização destes protocolos trouxe impacto no aumento da sobrevida desses pacientes . O primeiro caso incluído no protocolo SIOPEL 1 (caso nº4) está vivo e em remissão clínica completa, há 12 anos.

Na análise da sobrevida dos doentes portadores de hepatoblastoma , além dos aspectos inerentes à agressividade do tumor, à sensibilidade aos esquemas quimioterápicos utilizados, à técnica cirúrgica empregada , é fundamental focalizar a qualidade da infra

estrutura para a terapia de suporte a estes doentes . Deve ser dada ênfase à disponibilidade de unidade de terapia intensiva , ao uso de hemoderivados e, principalmente, à pronta administração das terapias antimicrobianas de amplo espectro, preconizadas nos períodos de grave mielossupressão , induzida pela quimioterapia . Até 1998, o Centro Infantil Boldrini contava ,com apenas 10 leitos próprios . A maioria dos pacientes era internada em outros hospitais, com previsíveis prejuízos para o atendimento . Talvez isto pudesse explicar os 4 óbitos secundários à sepse, ocorridos naquela época . Estes eventos desfavoráveis influíram na taxa de 55% da sobrevida global avaliada em 12 anos , para os 20 pacientes do estudo (excluído o caso nº6 , por perda de seguimento após a realização de transplante hepático em outro Serviço). Cinquenta e cinco por cento dos pacientes do estudo, diagnosticados no período de agosto de 1984 até dezembro de 2001, e analisados em abril de 2003, estão vivos em um período de seguimento de 2,6 a 12 anos. Comparativamente às taxas de sobrevida da literatura , avaliadas em 10 anos , estas variam entre 60 e 75% (BROWN et al., 2000).

Marcadores de Imuno-histoquímica

Os mecanismos patogênicos responsáveis pelo desenvolvimento do hepatoblastoma permanecem obscuros . Como tumor embrionário , o hepatoblastoma é derivado de tecido indiferenciado . O rápido crescimento faz com que o tumor seja mais sensível aos agentes citotóxicos e , em alguns casos , à radioterapia (HABRAND et al. , 1992 ; von SCHWEINITZ et al. , 2000). A hipótese atualmente aceita é a de que as células do hepatoblastoma sejam derivadas de células hepáticas progenitoras (SCHNATER et al., 2003). Estudos epidemiológicos demonstraram maior incidência de hepatoblastoma em famílias portadoras de polipose adenomatosa, que apresentavam inativação do *adenomatous polyposis coli (APC)* , gene de supressão do tumor , localizado no cromossomo 5. Uma das funções deste gene é diminuir a regulação da β -Catenina. Em cerca de 67% dos pacientes com hepatoblastoma esporádico são observadas alterações do gene *APC* (SCHNATER et al., 2003). Entretanto , os pacientes com hepatoblastoma esporádico também apresentam mutações no próprio gene da β -Catenina (KOCH et al. , 1999 ; UDATSU et al. , 2001). Apesar da presença ou da ausência de mutações no gene da β -Catenina não terem valor prognóstico , sua localização

nuclear demonstra significativa correlação com a curta sobrevida destes pacientes (PARK et al. , 2001).

Para estudar o impacto da mutação da β -Catenina na expressão e distribuição celular da proteína nos hepatoblastomas , WEI et al (2000) analisaram, através de método de imuno-histoquímica , a expressão nuclear e citoplasmática da β -Catenina , em 11 pacientes com hepatoblastoma . Observaram , além da positividade da membrana citoplasmática dos tumores de origem epitelial , acúmulo predominante em núcleo , principalmente nos anaplásicos , nos de células embrionárias e nos macrotrabeculares e , em menor intensidade, nos subtipos mistos e teratóides . No componente fetal , presente em todos os casos de hepatoblastoma daquela série , houve maior expressão da β -Catenina em membrana citoplasmática , do que em núcleo. Os autores , ao correlacionarem esta positividade de expressão da β -Catenina no tecido hepático não tumoral ,esta proteína concentrou-se nas bordas das células, formando uma membrana linear demarcando os hepatócitos além da membrana e do citoplasma dos ductos biliares interlobulares . Sugerem que uma alteração da regulação desta proteína no fígado , no período embrionário , teria papel seletivo no processo de diferenciação desta órgão , podendo levar à formação de células tumorais. No presente estudo , para a leitura da reação de imuno-histoquímica para a β -Catenina, foi levada em consideração a expressividade deste marcador, tanto em núcleo quanto na membrana citoplasmática das células tumorais, embora o componente nuclear tivesse sido preponderante em todos os casos.

Dos 17 casos que tiveram a expressão da β -Catenina avaliada no momento da biópsia diagnóstica , em 10 ocorreu a positividade do marcador (58,8% dos casos) . A expressão da positividade deste marcador, no momento do diagnóstico , não influenciou na taxa da sobrevida global. Esta foi de 60% em 8 anos para os pacientes com expressão positiva da β -Catenina ao diagnóstico, resultados comparáveis àqueles com expressões negativas (n=7) que mantiveram sobrevida global de 57,1% , sem diferença estatística entre eles (p=0,94).

A análise da expressão da β -Catenina na peça cirúrgica , avaliada por imuno-histoquímica , foi realizada em 16 tumores . A expressão foi negativa em apenas dois casos. Destes últimos pacientes (casos nº 11 e 19), cujo tumor no momento cirúrgico

apresentou negatividade da β -Catenina , um faleceu por infecção no pós-operatório , e o outro (caso nº19) , cujo subtipo histológico era fetal puro , está vivo e em remissão contínua há 2,8 anos . Este paciente (caso nº 19), bom respondedor ao esquema quimioterápico, que apresentou negatividade da expressão da β -Catenina, tinha como fator de bom prognóstico, o subtipo histológico fetal puro . Este subtipo poderia , ser o determinante da boa evolução do paciente.

Por outro lado , a manutenção da positividade da expressão da β -Catenina no momento cirúrgico pode estar associada a um prognóstico favorável. No presente estudo, dentre 7 pacientes com a persistência da positividade da expressão da β -Catenina , 5 estão vivos e livres de doença (casos nº 7,8,10,16 e 18) . Em 4 destes foi diagnosticado o subtipo histológico fetal puro .

Foi expressivo o aumento da positividade da expressão da β -Catenina após os ciclos da quimioterapia utilizada . A análise do seu possível papel como fator de prognóstico ficou prejudicada pela predominância do subtipo histológico fetal puro na presente casuística . Não houve diferença estatística significativa entre os resultados, positivo ou negativo , para a β -Catenina neste momento cirúrgico ($p=0,36$). Os 13 casos com resultados positivos da expressão da β -Catenina (excluído o caso nº6, por perda de seguimento) , no momento da cirurgia programada, apresentaram uma taxa de sobrevida global em 12 anos , de 76,9% .

Não houve associação estatística na expressão nuclear da β -Catenina com o subtipo histológico e o estadio clínico ,relacionados à sobrevida destes pacientes. Nossos resultados sugerem que a expressão da β -Catenina está, provavelmente, correlacionada à patogênese do hepatoblastoma , com base na sua expressão predominante no subtipo histológico fetal puro.

O significado da positividade da expressão da β -Catenina, em núcleo ou em membrana citoplasmática , tem levado os pesquisadores a tentarem associá-la , não só ao subtipo histológico do hepatoblastoma , como também , com o prognóstico do paciente (CAMPBELL et al., 2001) .

PARK et al. (2001) analisaram a expressão nuclear e/ou citoplasmática da β -Catenina , também por imuno-histoquímica , em 30 pacientes com hepatoblastoma , tendo encontrado sua positividade em 19 casos (63%). No estudo de PARK et al. (2001) ,a

expressão da β -Catenina no núcleo da célula foi maior nos subtipos histológicos embrionário ($p=0,003$) e indiferenciado ($p=0,001$), quando comparados ao subtipo fetal. Isto levou os autores a sugerirem que este marcador possa ser fator de mau prognóstico para o hepatoblastoma . Em nosso estudo , não houve diferença de positividade na expressão da β -Catenina nos subtipos histológicos fetal puro e fetal/embrionário , ao diagnóstico .

Resultados semelhantes foram relatados por JENG et al. (2000) , estudando em 9 pacientes com hepatoblastoma , a expressão nuclear da β -Catenina ao diagnóstico , pelo método da imuno-histoquímica . O subtipo histológico preponderante foi o fetal/embrionário (5 casos). Em 8 destes 9 casos, com a expressão positiva da β -Catenina , por imuno-histoquímica , também mostraram a expressão gênica da β -Catenina , avaliada por PCR . Estes resultados sugerem o papel da β -Catenina na tumorigênese do hepatoblastoma . A localização da β -Catenina predominantemente nuclear , traduz-se pela super expressão dos genes alvos da β -Catenina , o *GSK-3 β* (*Glycogen synthase kinase-3 β*) , o *LEF* (*Lymphoid enhancer factor*) , o *Tcf* (*T-cell factor*) envolvidos no processo de translocação e modulação da transcrição nuclear , promovendo a progressão do hepatoblastoma (TAKAYASU et al.,2000 ; SCHNATER et al., 2003).

A quantificação dos índices de proliferação celular , por técnicas de imuno-histoquímica , tem sido um método útil para avaliar o potencial de metastatização e a propensão a recidiva dos tumores , correlacionando-se, portanto , ao prognóstico dos pacientes (van NHIEU et al,1999) . O Antígeno de Proliferação Celular (PCNA) , essencial para a síntese do DNA no ciclo celular , é uma proteína nuclear não histona, de 36-Kd. Sua expressão tem sido correlacionada *in vitro* com a fase tardia de G1 e a fase S do ciclo celular (NAGOSHI et al, 1994).

Como esperado , o hepatoblastoma sendo tumor com elevada taxa de proliferação celular , deveria ter alta expressão do PCNA . No momento do diagnóstico, 100% dos nossos pacientes apresentaram positividade deste marcador. No presente estudo , os índices do PCNA foram mais elevados nos tumores do subtipo histológico fetal/embrionário , variando a expressão de 8,2 a 90% (mediana de 25%). Considerando os tumores do subtipo histológico fetal puro, 64,2% destes casos apresentaram índices de PCNA que variaram de 4,8 a 75,2% , com mediana de 23% (9 de 12 pacientes).

Era prevista posterior redução dos índices do PCNA , nos tumores sensíveis à quimioterapia. Após 4 ciclos de quimioterapia intensiva , a expressão do PCNA se manteve positiva em 93,8% dos casos (mediana de 22,8%). No momento da cirurgia , foram estudados 15 espécimes . Excluiu-se o caso nº 1 , cuja expressão do PCNA foi positiva , sendo que a criança foi operada ao diagnóstico . Somente um paciente (caso nº 4) apresentou a negatividade do PCNA neste momento . O subtipo histológico do caso nº 4 era do tipo fetal puro . Este paciente está vivo e sem evidência de doença , pelo período de 12 anos de seguimento .

A falta da quantificação mais precisa desta expressão , por métodos eletrônicos (contagem automática das células através de *software* pré-programado), impede-nos , no presente estudo, de comprovar que a redução do PCNA estaria associada a maior sensibilidade à quimioterapia e , portanto, a um melhor prognóstico. Entretanto , a análise semi quantitativa feita em porcentagens de positividade , mostra discreta diminuição desta porcentagem, no momento cirúrgico . Ao diagnóstico , o valor médio da positividade do PCNA foi de 30% e , na peça cirúrgica , de 23,5% . Constituíram exceção , 2 casos (casos nº 15 e 18). O paciente nº 15 , cujo tumor era do subtipo fetal/embrionário , faleceu por progressão do tumor , refratário à quimioterapia . O paciente nº 18 está vivo , livre de doença há 2,9 anos , tendo com fator de bom prognóstico , ser portador de hepatoblastoma do subtipo histológico fetal puro. A sobrevida global para estes pacientes com expressão positiva do PCNA no momento cirúrgico foi de 76,9% em 8 anos.

RUGGE et al. (1998) analisaram 34 casos de hepatoblastoma , sendo 14 antes do tratamento e 20 após o uso de quimioterapia . A maior expressão do PCNA, tanto por imuno-histoquímica quanto por citometria de fluxo, correlacionou-se com o subtipo histológico embrionário .Uma significativa associação foi encontrada por aqueles autores, também, com o conteúdo do DNA e a porcentagem de células na fase S , em associação ao subtipo histológico fetal/embrionário. Na análise destes resultados , os autores não separaram os dados pré e pós uso da quimioterapia . Uma vez que os clones de alta proliferação neoplásica ,por exemplo o tipo embrionário, são mais sensíveis aos agentes antimetabólicos, concordamos com RUGGE et al. que mais estudos são necessários, para se correlacionar a ploidia do DNA , o índice de proliferação celular e a resposta à quimioterapia.

Em tumores com elevada taxa de proliferação celular como o hepatoblastoma, é pequena a porcentagem das células em fase de quiescência (fase G0). O Ki-67 é uma proteína nuclear não histona, com peso molecular de 395 Kd e de 345Kd . Está presente em todas as fases do ciclo celular (G1 , S , G2) e ausente na fase G0 (GERDES et al , 1991) . Pode ser encontrada nas células em proliferação, através de técnicas de imuno-histoquímica , determinando o potencial de metastatização e , consequentemente , o pior prognóstico nestes pacientes (ARA et al., 1997).

A expressão positiva do Ki-67 em nossa casuística, variou de 7 a 45,5% , resultados semelhantes aos de ARA et al.(1997) , que na análise de 18 casos de pacientes com hepatoblastoma ,também encontraram maiores índices de positividade deste marcador, antes do uso da quimioterapia. No presente estudo ,os achados de imuno-histoquímica para o Ki-67 , realizados em 17 casos ao diagnóstico , foram positivos em 88,3% dos pacientes (n=15). No momento da cirurgia a expressão do Ki-67 permaneceu positiva em 2 casos (SG=50%). É interessante enfatizar que os pacientes com expressão positiva para o Ki-67 também o foram para a β -Catenina .A sobrevida global avaliada em 12 anos de seguimento, para os pacientes com esta expressão positiva do Ki-67 , foi de 66,7%. Os 2 casos com expressão negativa do Ki-67, ao diagnóstico, evoluíram para óbito por progressão da doença . Eram pacientes refratários à quimioterapia , sendo um deles, do subtipo histológico fetal puro (caso n°2) e o outro paciente , portador de tumor do subtipo histológico fetal/embrionário (caso n°5).

Como resultado da eficácia da quimioterapia , a população de células em G0 deveria progressivamente aumentar durante o tratamento. Assim , no momento cirúrgico , houve uma inversão na expressão do Ki-67, ficando negativo em 84,6% dos tumores . Nos 11 casos cujo resultado do Ki-67, avaliado na peça cirúrgica, foi negativo, a sobrevida global para estes doentes , avaliados após 12 anos foi de 90%. Nos dois casos com resultado positivo no momento cirúrgico (casos n° 15 e 16) , a curva de sobrevida livre de eventos foi de 50% em 4 anos . Ambos eram do subtipo histológico fetal/embrionário.

Estes resultados sugerem que o Ki-67 possa ter valor prognóstico no comportamento biológico do hepatoblastoma , assim como poderia identificar o grupo de risco que se beneficiaria com esquemas terapêuticos mais agressivos ,após a cirurgia. Os pacientes que tiveram negatificação do Ki-67 no momento cirúrgico , após o uso de

quimioterapia , tiveram melhor prognóstico . Todavia , o pequeno número de pacientes (13) da amostra estudada para o Ki-67 no momento cirúrgico , não permitiu definir a significância estatística para o melhor prognóstico aos pacientes com negatividade desta expressão ($p=0,22$).

Não se pode estudar o ciclo celular , sem analisar o comportamento da proteína p53 , que ocupa posição chave nos mecanismos de proliferação e reparo do DNA . Seu papel na patogênese do hepatoblastoma, ainda não está estabelecido. O gene p53 tem importante papel na função celular , como crescimento e diferenciação. Sua expressão protéica , a proteína p53 , é uma proteína reguladora da proliferação celular (RUCK et al., 1994 ; CHEN et al., 1995; ZERBINI et al., 1998). Em alguns casos de hepatoblastoma , a expressão positiva da proteína p53 é detectada por imuno-histoquímica ,sem que a mutação gênica do p53 esteja presente (SCHAFF et al. , 1995). A expressão positiva da proteína p53 tem sido descrita em vários tumores, incluindo tumores hepáticos , especialmente nos hepatocarcinomas, existindo poucas referências sobre sua expressão nos hepatoblastomas (CHOI et al.,1993; KENNEDY et al., 1994 ; SCHAFF et. al., 1995).

No presente estudo , a análise do p53 por imuno-histoquímica foi realizada em 17 pacientes no momento da biópsia diagnóstica . A expressão foi positiva em apenas 5% (caso nº13). Resultados de maior expressão , feitos pela mesma técnica de imuno-histoquímica , foram obtidos por ZERBINI et. al.(1998), encontrando a positividade do p53 em 9 de 21 pacientes com hepatoblastoma (42%).

Em nossa casuística , quando a expressão gênica do p53 foi pesquisada pela técnica de *FISH* em oito casos , esta foi positiva em cinco pacientes (62,5%) . Este fato sugere que a técnica de *FISH* , realizada em tecido fresco do tumor , deva ser a recomendada na atualidade. Por esta razão , por diversidade de natureza metodológica , houve dificuldade na análise do comportamento evolutivo da proteína p53 no presente estudo . Corrobora para esta dificuldade o pequeno número de casos estudados . Destes 5 casos , apenas 1 teve a expressão do p53 positiva, tanto por imuno-histoquímica quanto pelo *FISH* (caso nº 13).O subtipo histológico desta paciente era fetal/embrionário . A mesma encontra-se viva sem evidência de doença , há 5,4 anos de seguimento.

A sobrevida global avaliada em 12 anos para os pacientes com expressão negativa para o p53 ,no momento do diagnóstico, foi de 56,2% em 12 anos . Na peça cirúrgica , a expressão do p53 por imuno-histoquímica foi pesquisada em 16 casos, com apenas 1 resultado positivo (caso nº 15) , cujo tumor era do subtipo histológico fetal/embrionário. Este paciente desenvolveu resistência à quimioterapia , falecendo por progressão de tumor. A negatividade da expressão do p53 na peça cirúrgica teve, no grupo de 15 doentes, a sobrevida global em 12 anos de 78,6% . Isto sugere que a ausência da expressão do p53 possa ser fator de bom prognóstico.

Analisando a biologia do tumor por outros mecanismos , indiretamente vinculados ao ciclo celular , estudamos a expressão do c-erb-B2 no hepatoblastoma .O c-erb-B2 é um proto-oncogene com 185Kd , da família da tirosinoquinase , com receptor para o fator de crescimento celular . Sua expressão positiva, já determinada em alguns tipos de câncer (ovário, mama , hepatocarcinoma e cólon), é indicativa de pior prognóstico (HEINZE et al., 1999) . Não há , entretanto , publicações do seu comportamento em hepatoblastomas.

No presente estudo ,a expressão do c-erb-B2 foi realizada pela técnica de imuno-histoquímica ,em 14 pacientes com hepatoblastoma. No momento da biópsia diagnóstica ,a expressão foi positiva em 8 casos (57%) . A taxa de sobrevida global avaliada em 8 anos de seguimento , de acordo com a positividade do c-erb-B2 , foi de 87,5% , comparativamente àqueles pacientes com resultados negativos deste proto-oncogene ao diagnóstico , que tiveram pior prognóstico , com sobrevida global em 12 anos de 33,3% ($p=0,02$).A positividade da expressão do c-erb-B2 no momento do diagnóstico , mas principalmente após 4 ciclos de quimioterapia , esteve mais associada ao subtipo histológico fetal puro.

Após os 4 ciclos de quimioterapia, a análise do c-erb-B2 foi realizada em 14 peças cirúrgicas. Onze delas (78%) obtiveram resultado positivo dessa expressão . A sobrevida global avaliada em 12 anos seguimento , para os pacientes com c-erb-B2 positivo no momento cirúrgico, foi de 72,7%. O subtipo histológico fetal puro foi preponderante neste grupo , sendo encontrado em 7 pacientes . Dois casos apresentaram, no momento cirúrgico , resultado negativo do c-erb-B2 , entretanto , apresentavam o subtipo histológico

fetal puro . Estes dois pacientes estão vivos após 8 anos de seguimento . Embora não tenha havido diferença estatística na sobrevida dos pacientes, de acordo com a presença ou ausência da expressão do c-erb-B2 no momento cirúrgico ($p=0,44$) , o componente fetal puro deve ter contribuído para valor preditivo de bom prognóstico para este marcador .

A glicoproteína P (GpP) , que é um canal de membrana codificado pelo gene *MDR1*, representa uma possível explicação para o desenvolvimento de resistência às drogas nos pacientes portadores de hepatoblastoma (WARMANN et al.,2002). A ausência de sua expressão talvez justificasse a não necessidade do uso de terapêutica citotóxica agressiva .

Em 17 pacientes desta casuística, a GpP foi testada por método de imuno-histoquímica, no momento do diagnóstico . Apenas dois pacientes tiveram resultados positivos (11%) . Estes dois pacientes estão vivos e sem doença ,com uma sobrevida global acima de 4 anos . Em um deles , o tumor era do subtipo fetal puro (caso nº18) e o outro , do subtipo histológico fetal/embrionário (caso nº16).

No momento cirúrgico , a positividade da expressão da GpP foi de 31% , indicando o incremento da resistência à quimioterapia, após a utilização dos 4 ciclos . Três pacientes, que apresentavam resultado negativo ao diagnóstico , tiveram expressão da GpP positiva , no momento cirúrgico. Desses 3 casos , um deles (caso nº9) morreu por sepse , sendo o tumor do subtipo histológico fetal/embrionário .Os dois outros (casos nº7 e 14) estão vivos e sem doença , num período de 9 e 4,6 anos , respectivamente . Ambos tinham, como variável independente de bom prognóstico, o subtipo histológico fetal puro.

Na peça cirúrgica, 16 pacientes foram analisados quanto à expressão da GpP. Onze deles tiveram resultado negativo desta expressão , com uma taxa de sobrevida global de 70% em 12 anos de seguimento . Excluímos o caso nº6 , por perda de seguimento após a realização de transplante hepático em outro Serviço. Cinco pacientes (31%) expressaram a positividade para a glicoproteína P no momento da cirurgia , após o uso da quimioterapia , traduzindo o surgimento da resistência às drogas utilizadas . Dois deles , com resultados positivos também ao diagnóstico (casos nº 16 e 18), estão vivos e sem doença , no período de 3,9 e 2,9 anos de seguimento , respectivamente. O subtipo histológico deles é do tipo fetal/embrionário (caso nº 16) e fetal puro (caso nº 18).

A sobrevida global para os pacientes, de acordo com a expressão positiva da GpP no momento cirúrgico , foi de 80% em 9 anos , sem diferença estatística com os pacientes que apresentaram resultados negativos neste mesmo momento ($p=0,67$). Na casuística do presente estudo , não foi possível determinar a importância da GpP ao diagnóstico ou no momento cirúrgico , para os pacientes portadores de hepatoblastoma.

Sendo o hepatoblastoma um tumor incidente com maior frequência antes dos 3 anos de idade , esforços devem ser feitos no sentido da definição dos fatores de risco de mau prognóstico , que justificariam a poliquimioterapia mais ablativa. A terapia citotóxica atualmente proposta é agressiva , provocando vários efeitos tardios nestes pacientes , como surdez , cardiotoxicidade e tubulopatias , entre os mais frequentes . Por outro lado , talvez a terapia pudesse ser diminuída , caso pudessemos estabelecer os fatores prognósticos , ao diagnóstico e no momento cirúrgico , para este tipo de tumor , objetivando a melhoria da qualidade de vida destes pequenos pacientes.

6 - CONCLUSÕES

- 1- Não houve associação entre os grupos clínicos , os achados histopatológicos dos pacientes com hepatoblastoma estudados e a expressão da β -Catenina , do PCNA , do Ki-67 , do p53 e da GpP , nos momentos do diagnóstico e da cirurgia .
- 2- A positividade da expressão do c-erb-B2 , quer por ocasião do diagnóstico mas , principalmente no momento cirúrgico , estava mais associada ao subtipo histológico fetal puro.
- 3- No diagnóstico do hepatoblastoma , o Ki-67 , a β -Catenina e o PCNA foram os marcadores de maior expressão no tecido tumoral.
- 4- A expressão da β -Catenina , avaliada ao diagnóstico e no momento cirúrgico, não influenciou a evolução clínica dos pacientes do estudo ($p=0,94$ e $p=0,36$, respectivamente).
- 5- A diminuição do Ki-67 no momento cirúrgico em relação aos níveis pré-quimioterapia , foi o achado mais freqüente , não sendo possível demonstrar sua importância prognóstica neste estudo ($p=0,22$).
- 6- A expressão positiva do proto-oncogene c-erb-B2 , no momento do diagnóstico , esteve associada a melhora da sobrevida dos pacientes com hepatoblastoma ($p=0,02$).
- 7- A expressão negativa da proteína p53 no momento cirúrgico , esteve associada a evolução favorável dos pacientes do estudo (sobrevida global em 12 anos de 78,6%).
- 8- A positividade da expressão da GpP, avaliada nos momentos do diagnóstico e da cirurgia , não teve influência na sobrevida destes pacientes com hepatoblastoma ($p=0,27$ e $p=0,67$, respectivamente).
- 9- O subtipo histológico fetal puro teve importância prognóstica , atuando como variável independente de risco ($p=0,02$).
- 10- Com protocolos terapêuticos mais modernos e sistematizados , houve tendência em melhorar o prognóstico dos pacientes com hepatoblastoma , tratados no Centro Infantil Boldrini .

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. Procedimentos Laboratoriais em Imuno-histoquímica: SANTOS, T.M.S.; WAKAMATSU, A.; KANAMURA, C.T.; NONOGAKI, S.; PINTO, G..A. Manual de Imunohistoquímica, Capítulo21. p. 237-257, 1999.

2. ANDERSEN, T.; PAUS, E.; NESLAND, J.M.; MCKENZIE, S.J.; BORRESEN, A.L. Detection of c-erb-B2 related protein in sera from breast cancer patients. Acta Oncol., v. 34, p. 499-504, 1995.

3. ARA, T.; FUKUZAWA, M.; OUE, T.; KOMOTO, Y.; KUSAFUKA, T.; IMURA, K.; OKADA, A. Immunohistochemical assesment of the MIB1 labeling index in human hepatoblastoma and its prognostic relevance. J. Pediatr Surg, v. 32 , nº 12, p. 1690-94, 1997.

4. BECK, W.T. Mechanisms of multidrug resistance in human tumor cells. The roles of P-glycoprotein, DNA topoisomerase II and other factors. Cancer Treat, v. 17, p. 11-20 (supplA), 1990.

5. BROCK, P.; SHAFFORD, E.; BRUGIERES, L.; PRITCHARD, J.; PERILONGO, G.; MAIBACH, R.; CZAUDERNA, P.; ARONSON, D.; MACKINLAY, G.; CHILDS, M.; RONDELLI, R.; PLASCHKES, J. Metastatic hepatoblastoma treated with a dose intensive multiagent chemotherapy regimen , results from the second study of the childhood liver tumor strategy group of the international society of pediatric oncology-SIOPEL 2. Proceedings of ASCO (1603), 2002.

6. BROWN, J.; PERILONGO, G.; SHAFFORD, E.; KEELING, J.; PRITCHARD, J.; BROCK, P.; DICKS-MIREAUX, C.; PHILLIPS, A.; VOS, A.; PLASCHKES, J. Pretreatment prognostic factors for children with hepatoblastoma – results from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) Study SIOPEL 1. Eur Jour of Cancer, v. 36, p. 1418-25, 2000.

7. BUENDIA, M.A. Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: Common and distinctive aspects. Med Ped Oncol, v. 39, p. 530-35, 2002.

8. CAMPBELL, R.J.; PIGNATELLI, M. Molecular histology in the study of solid tumours. *J Clin Pathol : Mol Pathol.* v.55, p. 80-2, 2002.
9. CHEN, T.C.; HSIEH, L.; KUO, T. Absence of p53 gene mutation and infrequent overexpression of p53 protein in hepatoblastoma. *J Pathol* , v. 176, p. 243-7, 1995.
10. CHOI SW , HYTIROGLOU P , GELLER AS , KIM SM , CHUNG KW , PARK DH , THEISE ND , THUNG SN . The expression of p53 antigen in primary malignant ephitelial tumors of the liver : na immunohistochemical study . *liver* 1993 : 13: 172-176.
11. CONRAN, R.M.; HITCHCOCK, C.L.; WACLAWIW, M.; STOCKER, J.T.; ISHAK, K.G. Hepatoblastoma: The prognostic significance of Histology Type. *Pediatric Pathology*, v. 12, p.167-83,1992.
12. DOUGLASS, E.C.; REYNOLDS, M.; FINEGOLD, M.; CANTOR, A.B.; GLICKSMAN, A. Cisplatin, vincristine and fluoracil therapy for hepatoblastoma : a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, v. 11, p. 96-99, 1993.
13. DOUGLASS, E.; FEUSNER, J.; REYNOLDS, M.; KING, D.; FINEGOLD, M.; HAAS, J.; KRAILO, M. A randomized trial of cisplatin/vincristine/5-fluoracil vs. Doxorubicin IV continuous infusion for the treatment of hepatoblastoma . results from the Pediatric Intergroup Hepatoma Study(CCG 8881/POG 8945). *Proceedings of ASCO* (1412), 1999.
14. EHLICH, P.; GREENBERG, M.; FILLER, R.M. Improved Long-term survival with preoperative chemotherapy for hepatoblastoma. *Journ Ped Surg*, v. 32, n. 7,:999-1003, 1997.
15. FEUSNER, J.; PLASCHKES, J. Hepatoblastoma and low birth weight: A trend or chance observation? *Med Pediatr Oncol*, v. 39, n. 5, p. 508-509, 2002.
16. FUCHS; J.; RYDZYNSKI, J.; VON SCHWEINITZ; D.; BODE, U.; HECKER, H.; WEINEL, P.; BÜRGER, D.; HARMS, D.; ERTTMANN, R.; OLDHAFER, K.; MILDENBERGER, H. Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma. A report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94. *Cancer*, v. 95, n. 1, p. 172-182, 2002.

17. GERDES, J.; LI, L.; SCHLUETER, C.; DUCHROW, M.; WOHLLENBERG, C.; GERLACH, C.; STAHRM, I.; KLOTH, S.; BRANDT, E.; FLAD, H.D. Immunobiochemical and Molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*, v. 138, n. 4, p. 867-873, 1991.
18. GERLACH, J.H.; KARTNER, N.; BELL, D.R. Multidrug resistance. *Cancer Surv*, v. 5, p. 25-46, 1986.
19. GONZALEZ-CRUSSI, F.; UPTON, M.P.; MAURER, H.S. Hepatoblastoma. Attempt at characterization of histologic subtypes. *Am J Surg Pathol* 6:599-612 , 1982.
20. HABRAND, J.L.; NEHME, D.; KALIFA, C. Is there a place for radiation therapy in the management of hepatoblastomas and hepatocellular carcinomas in children? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 23:525-531. Comment in : *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992; 23:675-676.
21. HARRIS, A.L.; HOCHAUER, D. Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncol*, v. 31, p. 205-13, 1992.
22. HEINZE, T.; JONAS, S.; KARSTEN, A.; NEUHAUS, P. Determination of the oncogenes p53 and c-erb B2 in the tumour cytosols of advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and correlation to survival time. *Anticancer Res*, v. 19, n. 4^A, p. 2501-3, 1999.
23. HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem*, v. 29, p. 575-80, 1981.
24. INAGAWA, S.; ITABASHI, M.; ADACHI, S.; KAWAMOTO, T.; HORI, M.; SHIMAZAKI, J.; YOSHIMI, F.; FUKAO, K. Expression and prognosis roles of β Catenin in hepatocellular carcinoma: Correlation with tumor progression and postoperative survival. *Clinical Cancer Research*, v. 8, p. 450-56, 2002.
25. ISHAK, K.G.; GLUNZ, P.R. Hepatoblastoma and Hepatocarcinoma in infancy and childhood. *Cancer*, v. 20, p. 396-422, 1967.

26. JENG, Y.M.; WU, M.Z.; MAO, T.L.; CHANG, M.H.; HSU, H.C. Somatic mutations of β -Catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma. *Cancer Letters*, v. 152, p. 45-51, 2000.
27. JETTE, L.; BEAULIEU, E.; LICLERC, J.M.; BELIVEAU, R. Cyclosporin A treatment induces over expression of P-glycoprotein in the kidney and other tissues. *Am J Physiol*, v. 270, p. 756-65, 1996.
28. JORDE, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M.J.; WHITE, R.L. Genética Médica. In: *Citogenética Clínica: A base cromossômica das doenças humanas*. 2000, 2ª ed., Guanabara Koogan, pg 97-121.
29. JOO, M.; KANG, Y.K.; KIM, M.R.; LEE, H.K.; JANG, J.J. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver*, v. 21, p. 89-95, 2001.
30. KAPLAN, E.L.; MEIER, P. Non-parametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc*, v. 53, p. 457-81, 1958.
31. KARTNER, N.; RIORDAN, J.R.; LONG, V. Cell surface P- Glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* v. 221, p. 1285-88, 1983.
32. KASAI, M.; WATANABE, I. Histologic classification of liver-cell carcinoma in infancy and childhood and its clinical evaluation. *Cancer*, v. 25, p. 552-63, 1970.
33. KASHANI-SABET, M.; WANG, W.; SCANLON, K.J. Cyclosporin A supresses cisplatin-induced c-fos gene expression in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, v. 265, p. 11285-88, 1990.
34. KENNEDY SM , MACGEOGH C , JAFFE R , SPURR K . Overexpression of the oncoprotein p53 in primary hepatic tumors of childhood does not correlate with gene mutations. *Human pathology* vol 25 n° 5 (May 1994).

35. KIM, H.; HAM, E.K.; KIM, Y.; CHI, J.; LEE, H.S.; PARK, S.H.; JUNG, Y.M.; MYUNG, N.K.; LEE, M.J.; JANG, J.J. Overexpression of Cyclin D1 and cdk4 in tumorigenesis of sporadic hepatoblastomas. *Cancer Letters*, v. 131, p. 177-183, 1998.
36. KING, D.; ORTEGA, J.; CAMPBELL, J.; HAAS, J.; ABLIN, A.; LLOYD, D.; NEWMAN, K.; QUINN, J.; KRAILO, M.; FEUSNER, J.; HAMMOND, D. The surgical Management of Children with incompletely resected hepatic cancer is facilitated by intensive chemotherapy. *J Pediatr Surg*, v. 26 n. 9, p. 1074-81, 1991.
37. KISS, A.; SZEPESI, A.; LOTZ, G.; NAGY, P.; SCHAFF, Z. Expression of transforming growth factor - α in hepatoblastoma. *Cancer*, v. 83, n. 4, p. 690-97, 1998.
38. KOCH, A.; DENKHAUS, D.; ALBRECHT, S.; LEUSCHNER, I.; VON SCHWEINITZ, D.; PIETSCH, T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res*, v. 59, p. 269-273, 1999.
39. LIST, A.F. Preclinical investigations of drug resistance. *Curr Opin Oncol*, v. 7, p. 19-27, 1995.
40. MAC KINLAY, E.L.; PRICHARD, J. A common language for childhood liver tumors. *Pediatr Surg Intent*, v. 7, p. 325-326, 1992.
41. MORITA, K.; OKABE, I.; UCHINO, J. The proposed Japanese TNM classification of primary liver carcinoma in infants and children. *Jpn J Clin Oncol*, v. 13, p. 361-69, 1983.
42. MURPHY, L.D.; HERZOG, C.E.; RUDICK, J.B. Use of Polymerase chain reaction in the quantification of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry*, v. 29, p. 10351-56, 1990.
43. NAGOSHI, M.; TSUNEYOSHI, M. Expression of proliferating cell nuclear antigen in Wilm's tumors: correlation between histologic classification and proliferative activity. *J Surg Oncol*; v. 55, p. 114-121, 1994.
44. ODA, H.; IMAI, Y.; RAKATSURU, Y. Somatic mutation of the APC gene in Hepatoblastoma and Hepatocellular Carcinoma in childhood. *Pediatr Hem Oncol*; v. 6, p. 361-5, 1989.

45. ORTEGA, J.A.; KRAILO, M.D.; HAAS, J.E.; KING D.R., ABLIN, A.R.; QUINN, J.J.; FEUSNER, J.; CAMPBELL, J.R.; LLOYD, D.A.; CHERLOW, J.; HAMMOND, G.D. Effective treatment of unresectable or metastatic hepatoblastoma with cisplatin and continuous infusion doxorubicin chemotherapy: a report from the Children's Cancer Study Group. *J Clin Oncol.*, v. 9, p. 2167-76, 1991.
46. ORTEGA, J.A.; RIOS, P.; MALOGOLOWKIN, M.H. Succesful treatment os hepatoblastoma with na intensified platinum regimen. *Proceedings of ASCO (2091)*, 1998.
47. PARK, W.S.; OH, R.R.; PARK, J.Y. OH, R.R.; PARK, Y., KIM, P.J.; SHIN, M.S.; LEE, J.H.; KIM, H.S.; LEE, S.H.; KIM, S.Y.; PARK, Y.G.; NA, W.G.; KIM, H.S.; JANG, J.J.; YOO, N.J.; LEE, J.Y. Nuclear localization of beta-catenin in an important prognostic factor in hepatoblastoma. *J Pathol.*, v. 193, p. 483-90. 2001.
48. PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. Multidrug resistance in human Cancer. *New Eng J Med*, v. 316, p. 1388-93, 1987.
49. PERILONGO, G.; SHAFFORD, E.A. Liver tumors. *Eur J Cancer*, v. 35, p. 953-58; 1999.
50. PERILONGO, G.; BROWN, J.; SHAFFORD, E.; BORCK P.; DE CAMARGO, B.; KEELING, J.W.; VOS; A. PHILIPS A.; PRITCHARD, J.; PLASCHKES, J. Hepatoblastoma presenting with lung metastases. *Cancer*, v. 89, p. 1845-53, 2000.
51. PERILONGO, G.; SHAFFORD, E.; BRUGIERES, L., BROCK, P.; MAIBACH, R.; RONDELLI, R.; CZAUDERNA, P.; ARONSON, D.; PLASCHKES, J. Cisplatin alone and delayd surgery, an effective treatment for standard risk hepatoblastoma, the most relevant finding of the SIOPEL 2. *Proceedings of ASCO (1571)*, 2002.
52. PIZZO, P.; POPLACK, D. Principles and practice of Pediatric Oncology. Tumors of the Liver, by Tomlinson G and Finegold M. chapter 29, 4th edition, JB Lippincott Company, pages: 847-864, 2002.
53. ROWLAND, J.M. Hepatoblastoma: Assessment of criteria for histologic classification. *Med Pediatr Oncol*, v. 39, p. 478-83, n. 5, 2002.

54. RUCK, P.; XIAO, J.C.; KAISERLING, E. p53 Protein Expression in Hepatoblastoma. An Immunohistochemical Investigation. *Pediatric Pathology*, v. 14, p. 79-85, 1994.
55. RUGGE, M.; SONEGO, F.; POLLICE, L.; PERILONGO, G.; GUIDO, M.; BASSO, G.; NINFO, V.; PENNELLI, N.; GAMBINI, C.; GUGLIELMI, M.; FABIANO, A.; LEANDRO, G.; KEELING, J.W. Hepatoblastoma: DNA nuclear content, proliferative indices, and pathology. *Liver*, v. 18, p. 128-133, 1998.
56. SETH A , PAPAS T . Principles of molecular Cell Biology of Cancer . General Aspects of Gene Regulation. Principles and Practice of Oncology ,JB Lippincott Company , Chapter 2, pg 32-33 , 4th edition , De Vitta Jr V , Hellman S, Rosenberg S , 1993.
57. STOCKER, J.T. Hepatoblastoma. *Semin Diagn Pathol* 11: 136-143, 1994.
58. TANIMURA, M.; MATSUI, I.; ABE, J. Increase risk of hepatoblastoma among immature children with a lower birth weight. *Cancer Research*, 1998; 58: 3032-3035.
59. TAKAYASU, H.; HORIE, H.; HIYAMA, E. Frequent deletions and mutations of the beta-catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma . *Clin Res* 2001;7:901-908.
60. SCHNATER, J.M.; KÖHLER, ES.; LAMERS WH, VON SCHWEINTZ D , ARONSON DC. Where do we Stand with Hepatoblastoma ? American Cancer Society , 2003 . Published online 16 July 2003 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
61. SCHAFF Z, SÁROSI I, HSIA CC , KISS .; TABOR E. p53 in malignant and benign liver lesions. *European Journal of cancer* vol 31^A, n°11,pp 1847-1850,1995.
62. SCHIMIDT D , HARMS D , LANG W . Primary malignant hepatic tumors in childhood. *Virchows Arch (Pathol Anat)* , 1985. 407:487-405.
63. TWENTYMAN PR , FOX NE , WHITE DJG . Cyclosporin A and its analogues as modifiers of Adriamycin and Vincristine resistance in a multidrug resistant human lung cancer cell line. *Br J Cancer* 56:55-57, 1987.

64. UDATSU Y , KUSAFUKA T , KURODA S , MIAO J , OKADA A High frequency of beta-catenin in an important prognostic factor in hepatoblastoma. *Pediatr Surg Int.*2001;17:508-512.
65. VAN NHIEU JT , RENARD CA , WEI Y CHERQUI D , ZAFRANI ES , BUENDIA MA . Nuclear Accumulation of mutated β -Catenin in Hepatocellular Carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J of Pathol* 1999; 155:703-710.
66. VAN TORNOUT, JM.; BUCKLEY, JD.; QUINN, JJ.; FEUSNER, JH.; KRAILO, M.; KING, D.; HAMMOND, G.D.; ORTEGA, J. Timing and magnitude of decline in α -fetoprotein levels in treated children with unresectable or metastatic hepatoblastoma are predictor of outcome : a report from Children's Cancer Group . *J Clin Oncol* 1997, 15 , 1190-1197.
67. VLASOFF, DM.; BASCHINSKY, DY.; DE YOUNG, BR.; MORRISON, CD.; NUOVO, GJ.; FRANKEL, WL. C-erb B2 (Her2/neu) Is Neither Overexpressed nor Amplified in Hepatic Neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002 Sep;10(3)237-41.
68. VON SCHWEINITZ ,D ; WISCHMEYER, P; LEUSCHNER, I ; SCHMIDT, D ; WITTEKIND, CH ; HARMS, D; MILDENBERGER, H. Clinico-pathological criteria with prognostic relevance in hepatoblastoma. *European journal of Cancer* , 1994 ,. 8:1052-1058.
69. VON SCHWEINITZ, D ; SCHMIDT ,D ; FUCHS, J ; WELTE ,K ; PIETSCH, T . Extramedullary hematopoiesis and intratumoral production of cytokines in childhood hepatoblastoma. *Pediatr Res* 1995; 38:555-563.
70. VON SCHWEINITZ D . Identification of risk groups in hepatoblastoma-anpother step in optimising therapy. *Eur J Cancer* .2000; 6:1343-1346.
71. VON SCHWEINITZ, D ; HECKER, H ; SCHMIDT-VON-ARNDT, G ; HARMS ,D . Prognostic Factors and Staging Systems in Childhood Hepatoblastoma. *Int.J. Cancer (Ped.Oncol.):*74,593-599(1997).

72. WARMANN, S; HUNGER, M; TEICHMANN, B; FLEMMING, P; GRATZ, KF; FUCHS, J. The role of MDR 1 gene in development of multidrug resistance in Human hepatoblastoma . Cancer. October 15, 2002 / volume 95 / number 8 .
73. WEI, Y; FABRE, M; BRANCHEREAU, S; GAUTHIER, F; PERILONGO, G; BUENDIA, MA Activation of β -catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastoma. Oncogene 2000 , 19 , 498-504.
74. WEINBERG, AG.; FINEGOLD, M.J. Primary hepatic tumors of childhood. Hum Pathol. v.14, p. 512-37, 1983.
75. ZERBINI, MCN; SREDNI, ST; GRIER, H; CRISTOFANI, L; LATORRE, MR; HOLLISTER, KA; ALVES, VAF.; WEINBERG, OS; PEREZ-ATAYDE, AR. Primary Malignant Epithelial tumors of the liver in children : a study of DNA content and oncogene expression. Pediatr and Dev Pathol 1 (4) , 270-280 , 1998.

8 - *ANEXOS*

FICHA DE CONSENTIMENTO

Nós, pais do (da) menor _____ portador (a) de hepatoblastoma, diagnosticado (a) e tratado (a) no Centro Infantil Boldrini, no período de 1984 até 2001, autorizamos a Dra. Simone dos Santos Aguiar, sob a orientação da Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise, a utilizar o material proveniente da biópsia diagnóstica e da cirurgia de nosso (a) filho (a) para a realização de estudos de imuno-histoquímica e de biologia molecular com o objetivo de pesquisar fatores prognósticos para este tipo de câncer. Estamos de acordo também, na a publicação destes resultados em revistas médicas, onde o nome de nosso (a) filho (a) será preservado.

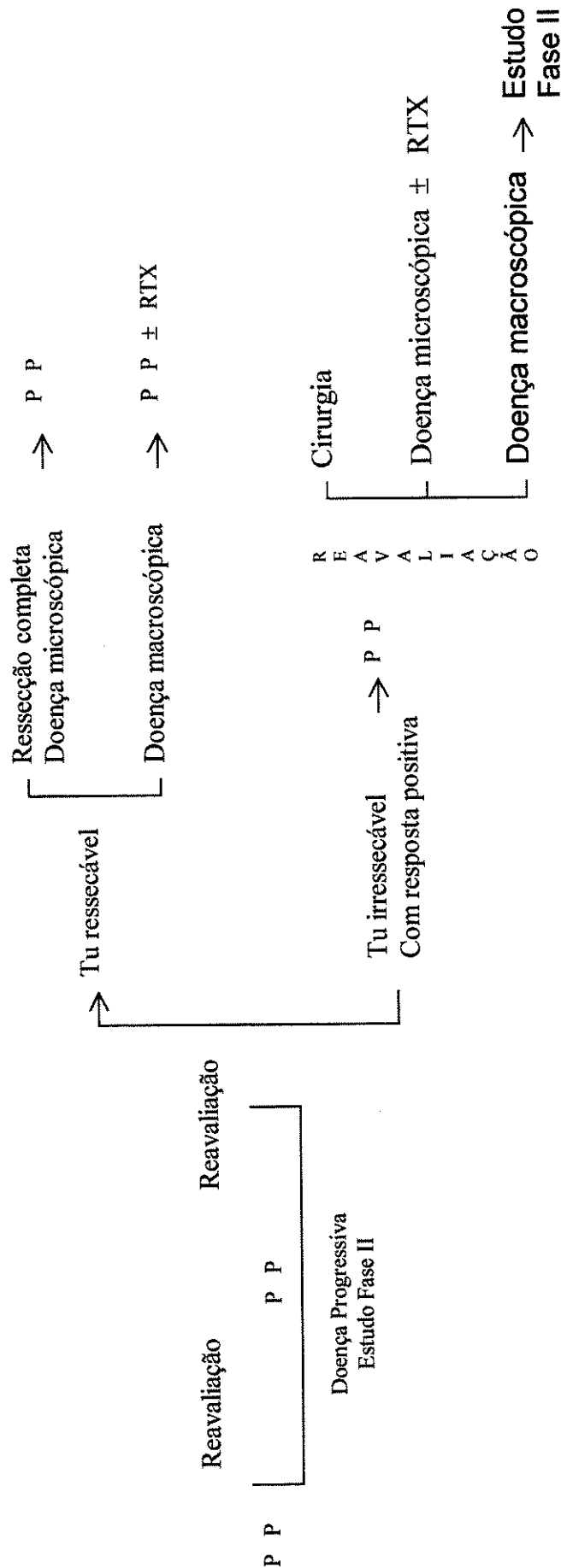
Campinas, ____ de _____ de 200__ .

Pai

Mãe

Protocolo Terapêutico para Hepatoblastoma em Pediatria

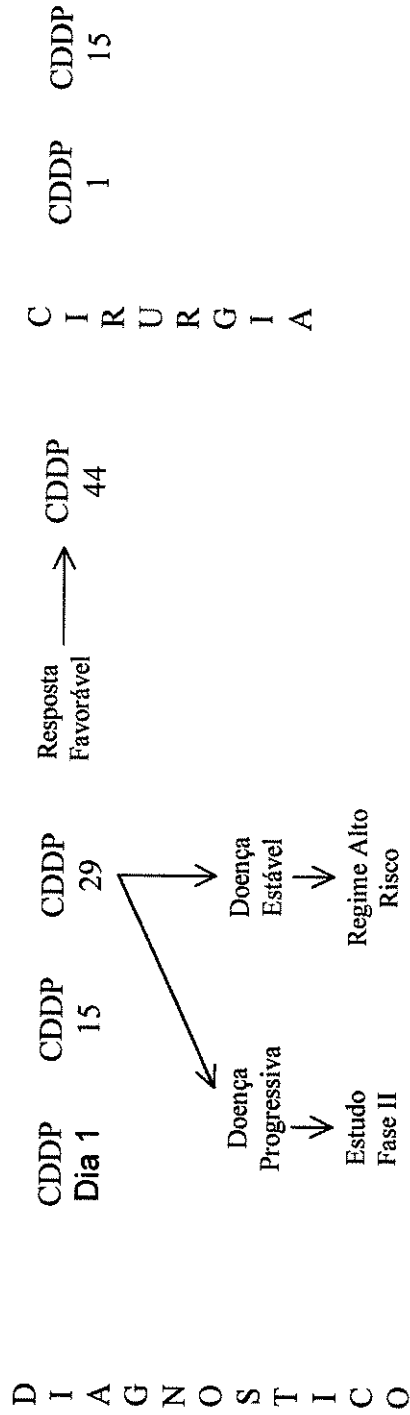
SIOPEL 1
(1990-1994)



P = PLADO = CISPLATINA 80mg/m²/dia inf. 24 h
ADRIAMICINA 30mg/m²/dia inf. 24 h x 2 dias

Protocolo Terapêutico para Hepatoblastoma em Pediatria

SIOPEL 2 – Baixo Risco * (1995-1998)



CDDP = CISPLATINA 80mg/m²/ dia inf. 24 h

* Pacientes Baixo Risco : Pacientes pertencentes aos Grupos I , II e III , sem acometimento extra-hepático pelo tumor , sem metástases.

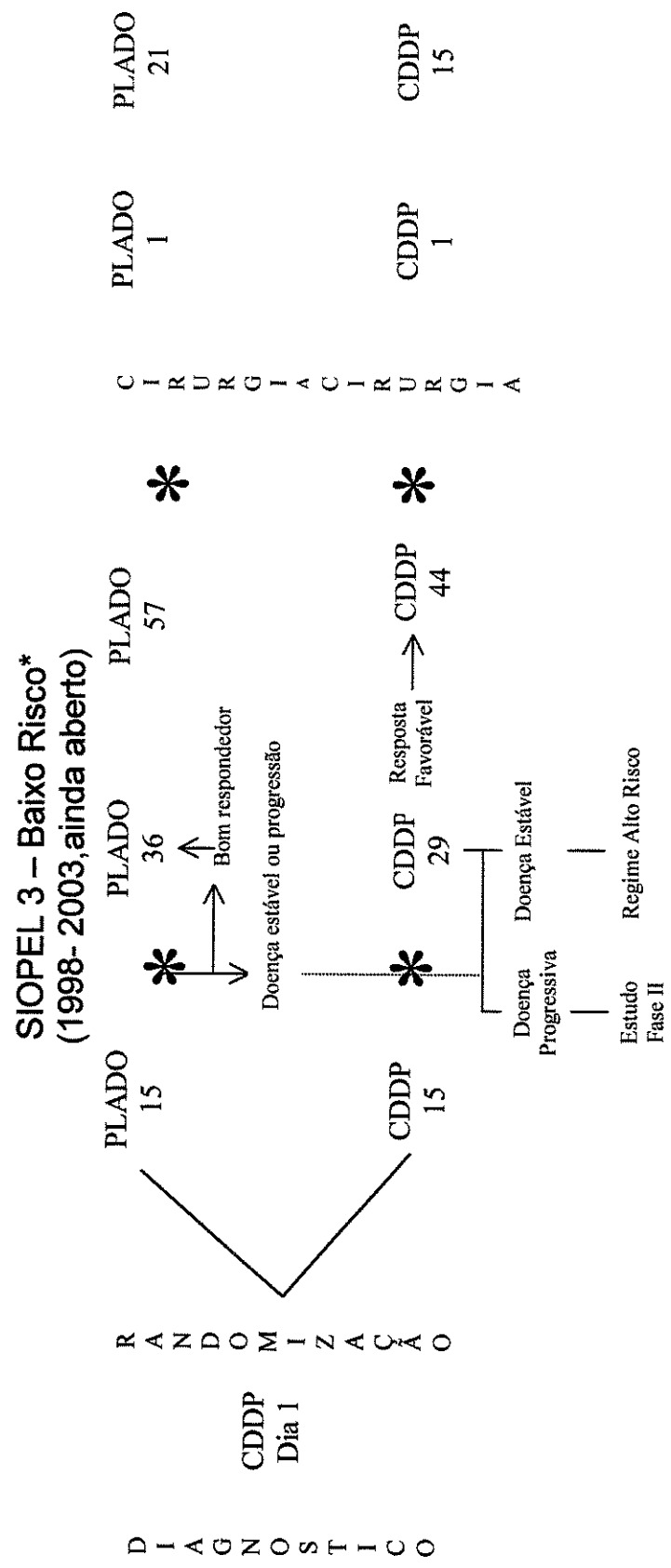
**SIOPEL 2 – Alto Risco*
(1995-1998)**

Considerar cirurgia, se possível

CDDP = CISPLATINA 80mg/m²/ dia inf. 24 h
DOXO = DOXORRUBICINA 60 mg/m² inf. 48 h
CARBO = CARBOPLATINA 500mg/m² inf. 1 hora

* Pacientes alto risco : pertencentes ao Grupo IV , e/ou com comprometimento abdominal extra-hepático pelo tumor , ou com presença de metástases.

Protocolo Terapêutico para Hepatoblastoma em Pediatria



* Pacientes Baixo Risco : Pacientes pertencentes aos Grupos I , II e III , sem acometimento extra-hepático pelo tumor , sem metástases.

Protocolo Terapêutico para Hepatoblastoma em Pediatria

SIOPEL 3 – Alto Risco*
(1998-2003, ainda aberto)

D I A G N O S T I C O

CDDP Dia 1	CARBO DOXO 15	CDDP 29	CARBO DOXO 43	*	CDDP 57	CARBO DOXO 71	CDDP 85	*	CARBO DOXO 1	CDDP 15	CARBO DOXO 29
				C I R U R G I A				C I R U R G I A			

Considerar cirurgia , se possível

CDDP = CISPLATINA 80mg/m2/ dia inf. 24 h
DOXO = DOXORRUBICINA 60 mg/m2 inf. 48 h
CARBO = CARBOPLATINA 500mg/m2 inf. 1 hora

* Pacientes alto risco : pertencentes ao Grupo IV , e/ou com comprometimento abdominal extra-hepático pelo tumor , ou com presença de metástases.

Protocolo Terapêutico para Hepatoblastoma em Pediatria

CCG N° 881/POG 8103 (8 ciclos)
(1978)

	D1	D2	D3	D22	D23	D24	D25	D31
Vincristina 1,5 mg/m ²								
Ciclofosfamida 500mg/m ²								
Adriblastina 25mg/m ²								
5FU 500mg/m ²								
Blenoxame 15 U/m ²								
Cisplatina 3mg/kg								

Protocolo Terapêutico para Hepatoblastoma em Pediatria

CISPLATINA + ADRIBLASTINA (8 ciclos) (1975)

D1 D2 D3 D4

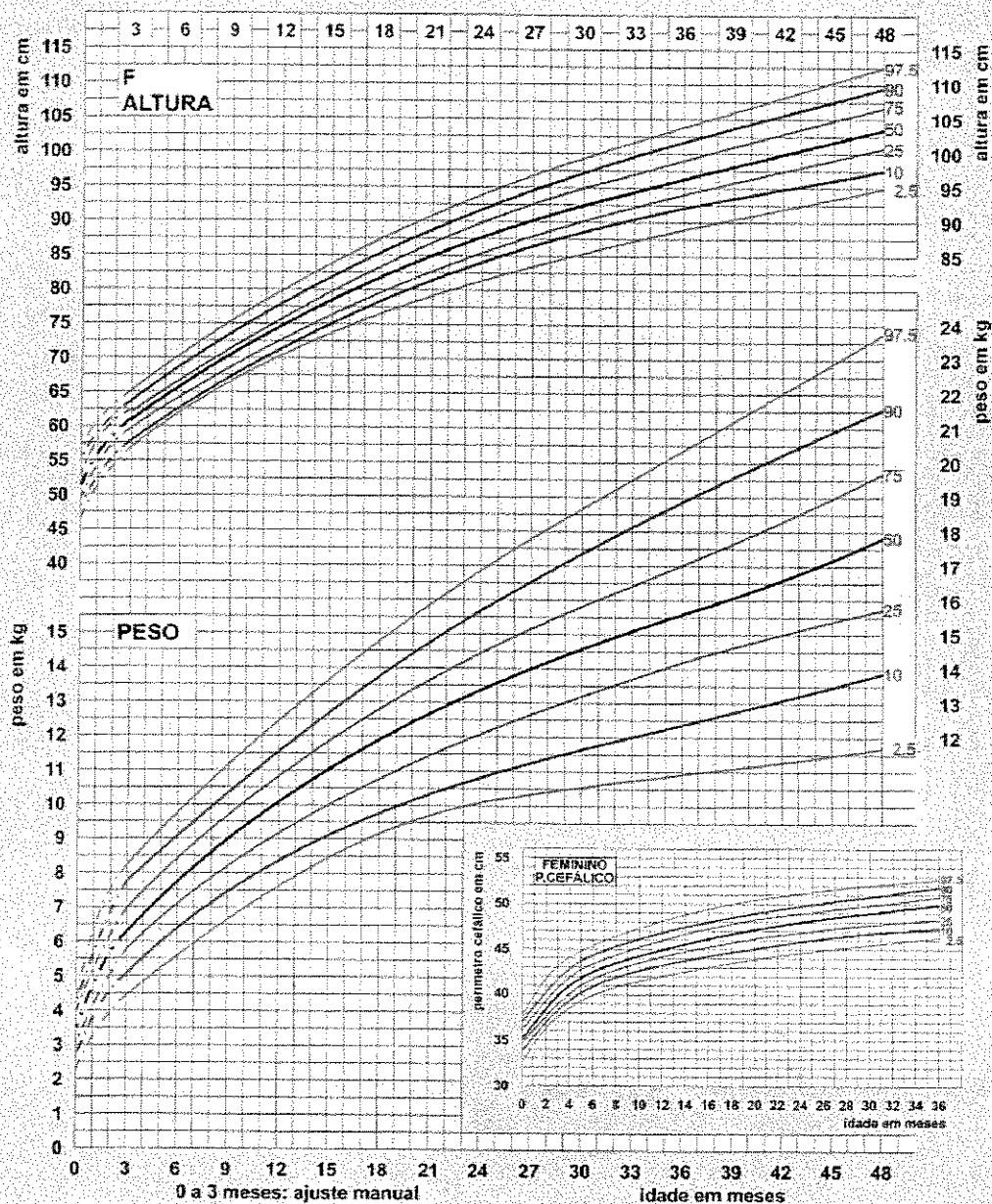
Cisplatina 20 mg/m²

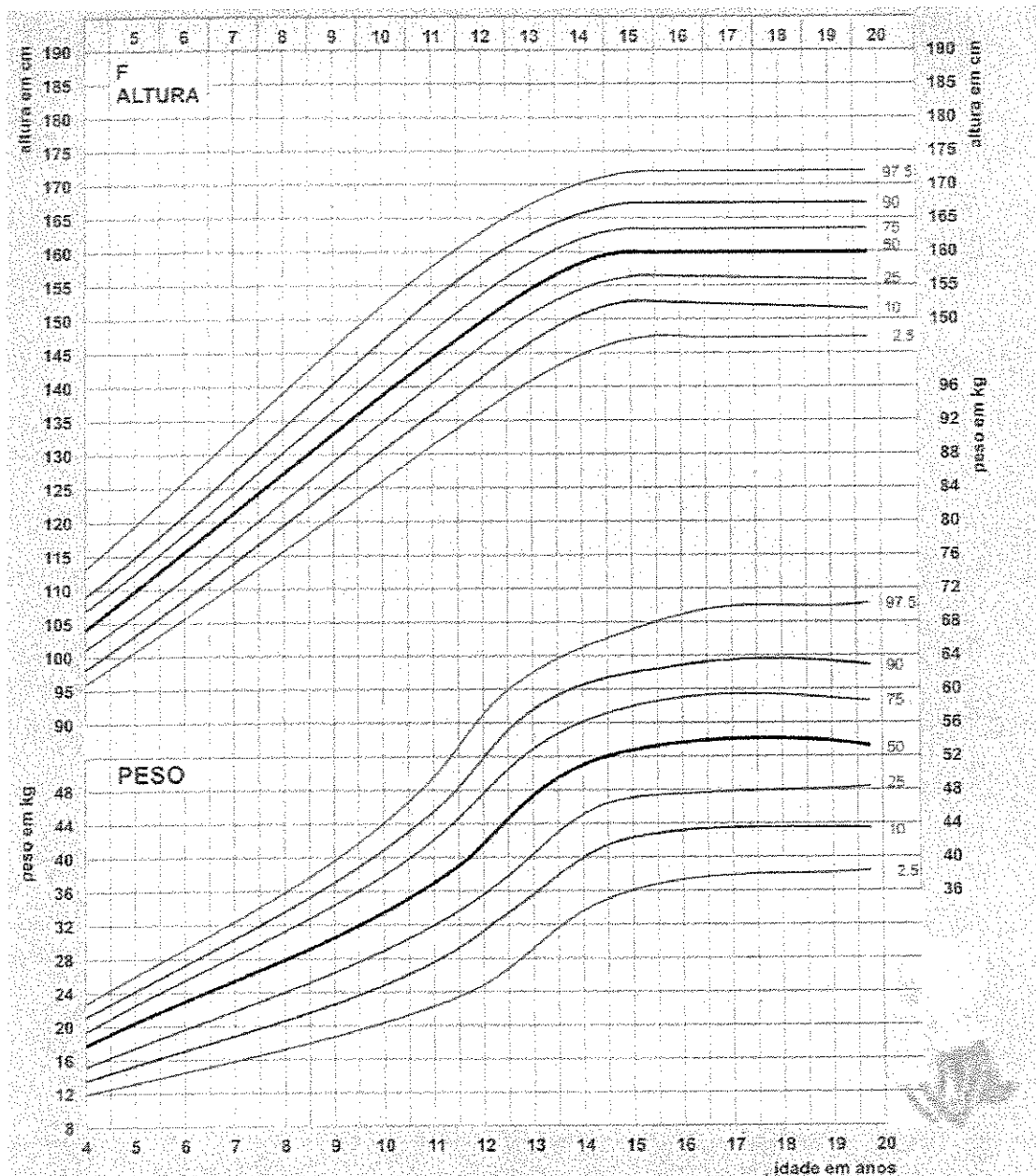
DESENVOLVIMENTO PONDERO-ESTATURAL MENINAS

NOME _____

NASCIMENTO: _____

PRONTUÁRIO: _____

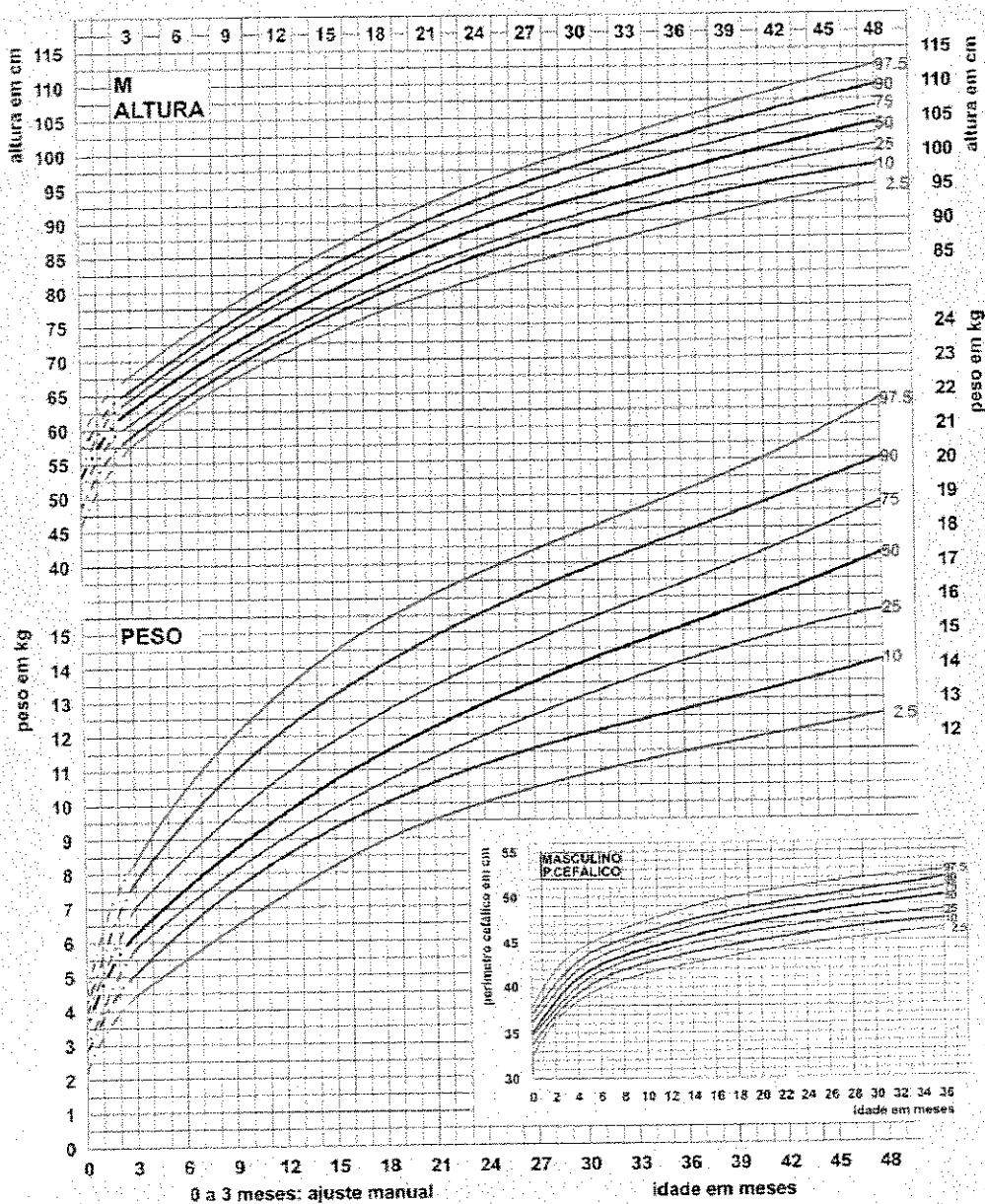


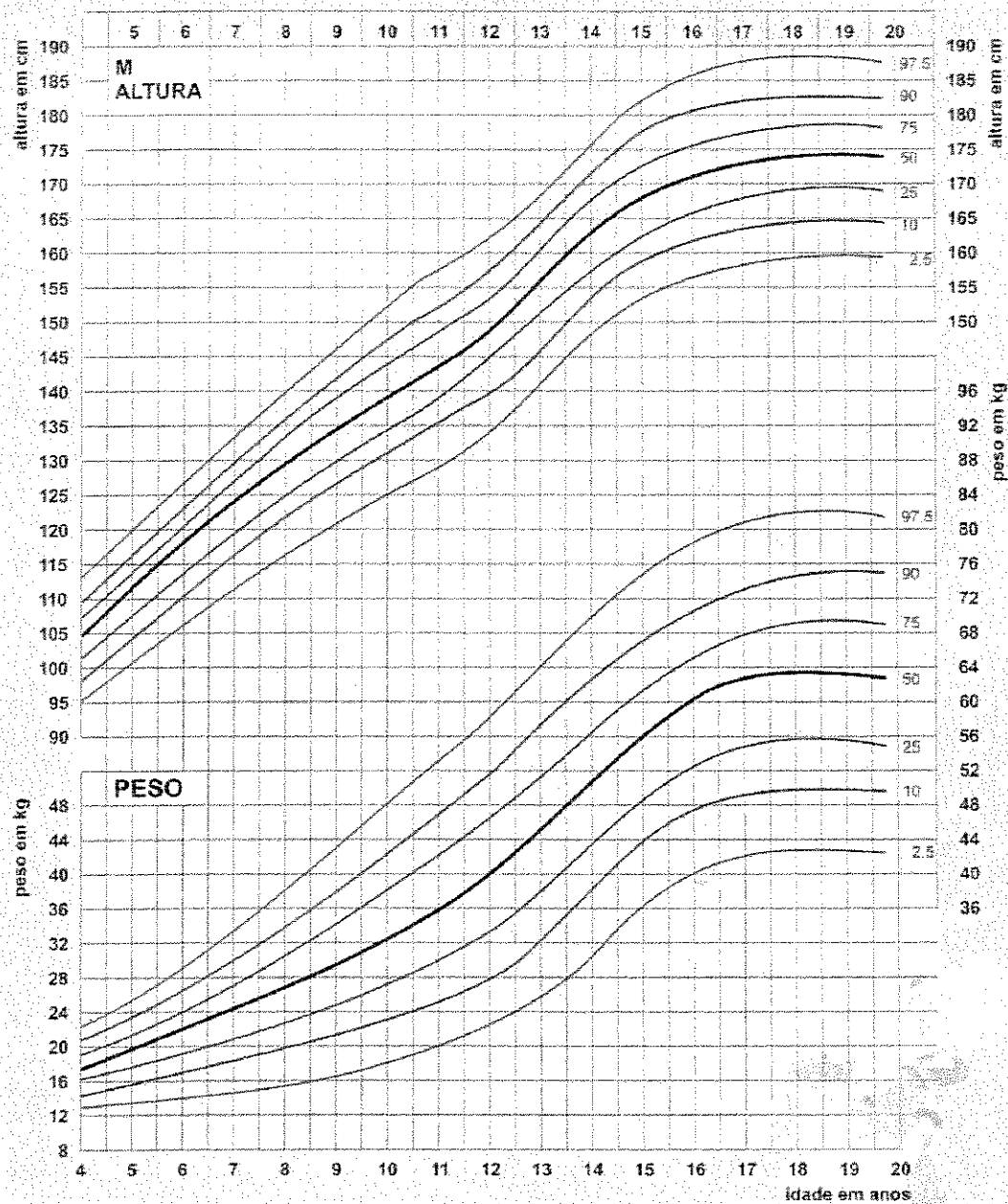


FONTES: 1. MARQUES, R. M.; MARCONDES, E.; BERTOLDI, D.; PRADO, F. L. V. M. S. J. - Crescimento e Desenvolvimento Pubertário em Crianças e Adolescentes Brasileiros. 1. Edição. São Paulo: Editora Brasiliense de Ciências, 1992.
 2. MARCONDES, E. & MARQUES, R. M. - Crescimento e Desenvolvimento Pubertário em Crianças e Adolescentes Brasileiros. 2. Edição. São Paulo: Editora Brasiliense de Ciências, 1993.
 3. BORDAS, G. H. & MARCONDES, E. - Crescimento e Desenvolvimento Pubertário em Crianças e Adolescentes Brasileiros. 3. Edição. São Paulo: Editora Brasiliense de Ciências, 1994.

DESENVOLVIMENTO PONDERO-ESTATURAL MENINOS

NOME: _____
NASCIMENTO: _____ PRONTUÁRIO: _____





FONTES 1 - MARQUES, R.M.; MARCONDES, E.; BERQUO, E.; PRANDI, R. & YUNES, J. - Crescimento e Desenvolvimento Puberdade em Crianças e Adolescentes Brasileiros. 8. Altura e Peso. São Paulo: Editora Brasileira de Ciências, 1982.
 2 - MARCONDES, E. & MARQUES, R.M. - Crescimento e Desenvolvimento Puberdade em Crianças e Adolescentes Brasileiros. 8. Altura e Peso. São Paulo: Editora Brasileira de Ciências, 1982.
 3 - MARCONDES, E. & MARQUES, R.M. - Crescimento e Desenvolvimento Puberdade em Crianças e Adolescentes Brasileiros. 8. Altura e Peso. São Paulo: Editora Brasileira de Ciências, 1982.

