**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

GRAZIELLA RIBEIRO DE SOUSA

**CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DE EPENDIMOMAS
PEDIÁTRICOS**

**Ribeirão Preto
2018**

GRAZIELLA RIBEIRO DE SOUSA

CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DE EPENDIMOMAS PEDIÁTRICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof.^o Dr. Luiz Gonzaga Tone

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sousa, Graziella Ribeiro de

Classificação molecular de ependimomas pediátricos.
Ribeirão Preto, 2018.

102 p.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Tone, Luiz Gonzaga.

1. Ependimoma. 2. Classificação molecular. 3. Ependimoma
supratentorial. 4. Ependimoma de fossa posterior.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (Processo nº 2017/23972-6);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- FMRP-USP e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Graziella Ribeiro de Sousa

Título: Classificação molecular de ependimomas pediátricos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Professor Doutor (Orientador):

Instituição:

Professor Doutor:

Instituição:

Professor Doutor:

Instituição:

Professor Doutor:

Instituição:

Dedico a minha dissertação à minha mãe e ao meu pai por me proporcionarem todas as oportunidades que eles não tiveram. Foram, são e serão sempre grandes incentivadores dos meus estudos, conselheiros e exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à *Deus*, meu verdadeiro mestre em todos os momentos e aos *meus familiares*, sempre presentes, mesmo na minha ausência. Essa conquista acima de tudo são deles.

Ao Prof^o *Dr. Luiz Gonzaga Tone* me acolheu como sua orientanda, me guiando e contribuindo para meu crescimento acadêmico. É e será uma honra ter um pesquisador como o senhor para compartilhar o seu conhecimento. Cresci muitos nesses últimos anos e, por isso, meu muito obrigada.

Ao Prof^o *Dr. Carlos Scrideli*, um exemplo de pesquisador. Muito obrigada pela contribuição e disponibilidade em me ajudar.

À Prof^a *Dra. Régia Caroline P. Lira*, pela paciência e dedicação em me transmitir seu conhecimento. Sou imensamente grata por ter me ajudado a ser uma pessoa mais reflexiva e a cima de tudo pela amizade que construímos.

Às minhas companheiras de laboratório e amigas, *Keteryne R. da Silva* e *Taciani Magalhães*, somos melhores juntas. Esse trabalho não seria possível sem a imensa contribuição de vocês.

Ao Prof^o *Dr. José Andres Yunes*, *Dra. Suely K. N. Marie*, *Dra. Sueli M. Oba Shinjo*, pela disponibilidade e colaboração.

À bióloga *Dra. Rosane de Paula Gomes*, por ter se disponibilizado e me orientado inúmeras vezes.

Ao *Dr. Fabiano Saggioro* pela paciência e disponibilidade em me ajudar na análise de imunohistologia.

À Prof^a. *Dra. Maria Sol Brassesco* por ceder espaço e ambiente propício para o desenvolvimento deste trabalho.

À *Dra. Maristela Reis* e *Dr. Paulo Klinger* pelo auxílio na coleta de dados e o apoio clínico, meu muito obrigada.

À *Dra. Leandra N. Z. Ramalho* pela paciência e disponibilidade.

À todos os colegas de laboratório e com certeza da vida, *Carolina*, *Gabriela Vieira*, *Gustavo*, *Karina*, *Kleiton*, *Marcela*, *Mariana*, *Mirella*, *Milena*, *Luciana*, *Ricardo*, *Verena*, *Pâmela* e *Pablo*. Agradeço pela amizade, pela contribuição científica e por tornar meus dias cheios de “sorrisos” e com boas gargalhadas.

Às técnicas *Veridiana Kiil Suazo* e a *Elizabeth Perna* pelos ensinamentos e excelente auxílio técnico.

À *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)*, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a porta de entrada para este Mestrado, concedendo um espaço favorável a desenvolver nosso conhecimento, também deixo meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof^o *Dr. Aguinaldo Luiz Simões*, chefe do Departamento de Genética da FMRP-USP.

À Prof^a *Dra. Ester Silveira Ramos* coordenadora do programa de pós-graduação em Genética da FMRP-USP.

À secretária do Departamento de Genética *Susie Nalon*, pelas informações passadas durante meu mestrado.

Aos meus pais, *Maria das Dores* e *Augusto R de Sousa*, agradecerei por toda a minha vida a presença e a contribuição em minha formação humana, por serem base e sustentação em toda minha caminhada e à minha irmã, *Graciele*, pelo carinho e atenção que me deu sempre que precisei.

Ao *Filipe*, meu namorado, pela paciência, compreensão e incentivo durante esses anos.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pelo auxílio financeiro para execução deste projeto, bem como pela bolsa concedida durante esse período.

Enfim, fica aqui, a minha profunda gratidão, a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte deste trabalho.

*“Em algum lugar, algo incrível está esperando
para ser descoberto.”*

Carl Sagan

RESUMO

Sousa, G.R. Classificação molecular de ependimomas pediátricos [Dissertação de Mestrado]. Ribeiro Preto: Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2018. 102 p.

Introdução: Os ependimomas são tumores gliais raros e compreendem o terceiro tumor do sistema nervoso central mais frequente na infância. Apesar dos avanços terapêuticos, cerca de 50% dos pacientes desenvolvem recidiva local e 40% dos pacientes vão ao óbito. Uma das causas do insucesso das terapias é a alta heterogeneidade do tumor e a inconsistência do diagnóstico histológico. Em 2015, foi publicada pela primeira vez a caracterização molecular de ependimomas, sendo descrito nove subgrupos tumorais com perfis clínicos, demográficos e moleculares distintos. **Objetivo:** Estabelecer e padronizar a classificação molecular em amostras de ependimomas pediátricos e correlacionar a classificação com dados clínicos dos pacientes. **Casuística e Métodos:** Foram estudados 65 casos de ependimomas, diagnosticados no período entre 2001 a 2016 e provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e de São Paulo e do Centro Infantil Boldrini-Campinas. Vinte e seis casos eram ependimomas supratentoriais, classificados com base na presença de fusões gênicas *C11orf95-RELA*, *YAP1-MAMLD1* e *YAP1-FAM118B* utilizando RT-PCR seguida por sequenciamento de Sanger. Trinta e nove casos de fossa posterior foram classificados em Grupos A, B ou não A e B através do perfil de expressão proteica e gênica dos marcadores: LAMA2, NELL2 e TNC utilizando imuno-histoquímica e PCR quantitativo em tempo real, respectivamente. **Resultados:** Dentre os ependimomas supratentoriais foram identificadas três amostras primárias e cinco amostras recidivadas com presença de fusão *RELA*, média de idade de 7 anos (variação de 2,6-13,7 anos), predominância do sexo masculino e grau de ressecção cirúrgica completa. Já a fusão *YAP1-MAMLD1* foi identificada em quatro casos, diagnosticados em crianças mais novas, média de idade de 0,9 anos (variação de 0,75-2 anos). Adicionalmente, foi encontrado um caso variante em ependimoma supratentorial, denominado fusão *C11orf95-LOC-RELA*. Dentre os casos de ependimoma de fossa posterior, foram identificadas 26 amostras primárias e sete recidivas sugestivas de pertencerem ao Grupo A (*LAMA2*+/*NELL2* -) e seis amostras do Grupo não-A e não-B (*LAMA2* +/- *NELL2* + e *LAMA2* -/*NELL2*-). Entre os pacientes considerados Grupo A, 90% (24/28) apresentaram marcação positiva para TNC, indicando serem tumores de pior prognóstico. A expressão gênica de *LAMA2* e *NELL2* apresentou correlação negativa e os genes *TNC* e *LAMA2* uma correlação positiva, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente. Em ependimoma de fossa posterior Grupo A, os pacientes submetidos às ressecções completa e incompleta apresentaram diferença significativa na sobrevida global (5 anos) de $71,2\% \pm 14,5\%$ versus $21,4\% \pm 17,8\%$, $p < 0,01$ e na SLE (2 anos) $63,5\% \pm 14,8\%$ versus $25\% \pm 15,3\%$, $p < 0,001$. **Conclusões:** De acordo com os resultados obtidos foi possível estabelecer a classificação molecular em uma casuística brasileira, seguindo os padrões descritos na literatura. Dados gerados a partir dessa padronização serão de fundamental importância para melhoria da estratificação tumoral, contribuindo tanto para determinação de estratégias terapêuticas subgrupo-específicas, quanto na busca de novos alvos terapêuticos.

PALAVRAS-CHAVE: Ependimoma; Classificação molecular; Ependimoma supratentorial; Ependimoma de fossa posterior.

ABSTRACT

Sousa, G.R. Molecular classification of the pediatric ependymomas [Master's degree dissertation]. Ribeirão Preto: Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo; 2018. 102 p.

Introduction: Ependymomas are rare glial cell-derived tumors and comprise the third most frequent central nervous system tumor in childhood. Despite the therapeutic advances, about 50% of patients develop local recurrence and 40% of patients go to death. One of the causes of the failure of the therapies is the high tumor heterogeneity and the inconsistency of the histological diagnosis. In 2015, the molecular characterization of ependymomas was published for the first time, and nine tumor subgroups with distinct clinical, demographic and molecular profiles were described. **Aim:** To establish and standardize molecular classification in pediatric ependymoma samples and to correlate the classification with clinical data of the patients. **Methods:** We studied 65 cases of ependymomas, diagnosed between 2001 and 2016, from the Clinics Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto and São Paulo and the Boldrini Children's Center-Campinas. Twenty-six cases were supratentorial ependymomas, classified based on the presence of gene fusions *C11orf95-RELA*, *YAP1-MAMLD1* and *YAP1-FAM118B* using RT-PCR followed by Sanger sequencing. Thirty-nine posterior fossa cases were classified into Groups A, B or non A and B through the protein and gene expression profile of the markers: LAMA2, NELL2 and TNC using immunohistochemistry and quantitative real-time PCR, respectively. **Results:** Among the supratentorial ependymomas, three primary samples and five relapsed samples with *RELA* fusion, mean age of 7 years (range of 2.6-13.7 years), male predominance, and degree of complete surgical resection were identified. The *YAP1-MAMLD1* fusion was identified in four cases, diagnosed in younger children, mean age 0.9 years (range of 0.75-2 years). In addition, a variant case was found in supratentorial ependymoma, called fusion *C11orf95-LOC-RELA*. Twenty-six primary samples and seven recurrences suggestive of Group A (LAMA2 + / NELL2-) and six non-A and non-B Group samples (LAMA2 + / NELL2 + and LAMA2 - / NELL2-). Among the patients considered Group A, 90% (24/28) presented positive staining for TNC, indicating that tumors had a worse prognosis. The gene expression of *LAMA2* and *NELL2* presented negative correlation and the *TNC* and *LAMA2* genes had a positive correlation, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively. In the group A posterior fossa ependymoma, patients submitted to complete and incomplete surgical presented a significant difference in overall survival (5 years) of $71.2\% \pm 14.5\%$ versus $21.4\% \pm 17.8\%$, $p < 0.01$ and in SLE (2 years) $63.5\% \pm 14.8\%$ versus $25\% \pm 15.3\%$, $p < 0.001$. **Conclusions:** According to the results obtained, it was possible to establish the molecular classification in a Brazilian cohort, following the standards described in the literature. Data generated from this standardization will be of fundamental importance for the improvement of tumor stratification, contributing both to the determination of subgroup-specific therapeutic strategies and to the search for new therapeutic targets.

KEY WORDS: Ependymoma; Molecular Classification; Supratentorial ependymoma; Posterior fossa ependymoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação molecular do EPN de todos os compartimentos anatômicos em graus histológicos, grupos etários e estratificação de risco	27
Figura 2- Transcritos e proteínas dos subtipos da fusão <i>RELA</i> , fusão <i>YAP1-MAM</i> e fusão <i>YAP1-FAM</i>	33
Figura 3- Transcritos de fusões <i>RELA</i> tipos 1 e 2 em amostras controle	53
Figura 4- Transcritos de fusões <i>RELA</i> tipo 1 e 2 nas amostras de EPN-ST pediátricas	55
Figura 5- Transcrito da fusão <i>C11orf95-LOC-RELA</i> detectada em uma amostra de EPN-ST e imuno-marcação desse caso para p65/RELA	56
Figura 6- Transcritos de fusões <i>YAP1-MAM</i> nas amostras de EPN-ST pediátricas.	57
Figura 7- Imagens ilustrativas do gel de agarose para a RT-PCR da fusão <i>YAP1-FAM</i>	58
Figura 8- Imagens de lâminas de imuno-histoquímica utilizadas para classificação molecular das amostras de EPN-FP	61
Figura 9- Distribuição das amostras de EPN-FP em relação a marcação com os anticorpos LAMA2 e NELL2	62
Figura 10- Imagens de lâminas de imuno-histoquímica de EPNs adultos	63
Figura 11- Correlação de expressão gênica e expressão proteica e correlação de <i>Pearson</i>	65
Figura 12- Expressão de <i>LAMA2</i> , <i>TNC</i> e <i>NELL2</i> em amostras de EPN FP de tumores pediátricos <i>versus</i> tumores de adultos	67
Figura 13- Imagens ilustrativas de géis de agarose de RT-PCR das fusões <i>RELA</i> tipo 1 e 2, <i>YAP1-MAM</i> e <i>YAP1-FAM</i> em amostras de EPN FP	68
Figura 14- Curva de <i>Kaplan-Meier</i> mostrando o tempo sobrevida de acordo com grau de ressecção cirúrgica.	69
Figura 15- Curva de <i>Kaplan-Meier</i> mostrando o tempo sobrevida de pacientes EPN FP Grupo A	71
Figura 16- Classificação molecular em amostras de EPN FP e ST	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados clínicos referentes a idade, gênero, localização anatômica, grau histológico, grau de ressecção, tratamento, presença de recidiva e desfecho clínico (vivo ou óbito) dos pacientes incluídos no estudo (NA= não avaliado)	45
Tabela 2- Sequência dos <i>primers</i> e tamanho dos produtos de PCR (pares de base - pb), de acordo com os protocolos de Parker et al. (2014) e Pajtler et al. (2015)	47
Tabela 3- Programação do termociclador para a realização das reações de PCR ..	47
Tabela 4- Programação do termociclador para realização das reações de sequenciamento	48

LISTA DE ABREVIATURAS

BMPs- *bone morphogenetic proteins*

BSA- *bovine serum albumin*

C11orf95- *chromosome 11 open reading frame 95*

cAMP- *3'-5'-cyclic adenosine monophosphate*

CDKN2A- *cyclin dependent kinase 2a*

cDNA- *DNA complementar*

CERN- *Collaborative Ependymoma Research Network*

CIB- *Centro Infantil Boldrini-Campinas*

CIMP- *CpG island methylator phenotype*

CpG- *dinucleóticas de citosina guanina (CpG)*

C_T- *cycle threshold (limiar do ciclo)*

EGFR- *epidermal growth factor receptor*

EMA- *epithelial membrane antigen*

EPN-FP- *ependimoma de fossa posterior*

EPN-ME- *ependimoma medular*

EPNs- *ependimomas*

EPN-ST- *ependimoma supratentorial*

EZH2- *enhancer zeste homolog 2*

FAM118B- *family with sequence similarity 118 member B*

FP- *fossa posterior*

GFAP- *glial fibrillary acidic protein*

GUSB- *glucuronidase beta*

Gy- *grays*

H3K27- *histone H3 lysine 27*

HC/FMRP-USP- *Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto*

HC/FM-USP- *Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*

HDAC4- *histone deacetylase 4*

HIF-1 α - *hypoxia-inducible factor-1*

HOX- *homeobox*

HPRT- *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*

IHQ- *imuno-histoquímica*

L1CAM- *L1 cell adhesion molecule*

LAMA2- *laminin alpha-2*
LCR- fluxo do líquido cefalorraquidiano
MAMLD1- *mastermind like domain containing 1*
MAPK- *mitogen activated protein kinase*
NCAM- *neural cell adhesion molecule*
NELL2- *neural epidermal growth factor like-2*
NF2- neurofibrina 2
NF-kB- *nuclear factor-Kappa B*
OLIG2- *oligodendrocyte transcription factor*
OMS- Organização Mundial da Saúde
OTX2- *orthodenticle homeobox 2*
PBS (tampão fosfato salina)
PDGF- *platelet-derived growth factor*
PRC1- *polycomb repressor complex 1*
Prof.- Professor
RAS- *rat sarcoma vírus*
RELA- *v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A*
RM- ressonância magnética
SG- sobrevida global
SLE- sobrevida livre de eventos
SNC- sistema nervoso central
TC- tomografia computadorizada
TGF-B- *transforming growth factor beta*
TMZ- temozolomida
TNC- tenascina-C
VEGF- *vascular endothelial growth factor*
YAP1- *yes-associado a proteína 1*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Ependimoma	21
2.2. Dados epidemiológicos	22
2.3. Características e Subtipos Histológicos	23
2.3.1. Classificação Histopatológica	24
2.3.1.1. <i>Subependimoma (Grau I)</i>	24
2.3.1.2. <i>Ependimoma mixopapilar (Grau I)</i>	24
2.3.1.3. <i>Ependimoma clássico (Grau II)</i>	25
2.3.1.4. <i>Ependimoma anaplásico (Grau III)</i>	25
2.4. Classificação Molecular	26
2.4.1. <i>Ependimoma de Fossa Posterior (EPN-FP)</i>	27
2.4.2. <i>Ependimoma Supratentorial (EPN-ST)</i>	30
2.4.3. Ependimoma Medular (EPN-ME)	33
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
4.1. Desenho Experimental	43
4.2. Casuística	44
4.3. Extração de RNA e síntese de cDNA	46
4.4. RT-PCR	46
4.5. Sequenciamento de Sanger	47
4.6. PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	48
4.7. Análise da expressão gênica <i>in silico</i>	49
4.8. Expressão proteica de LAMA2, TNC e NELL2	49
4.9. Análise Estatística	50
5. RESULTADOS	53

5.1.	Classificação molecular de EPNs supratentoriais	53
5.2.	Classificação molecular de EPNs de Fossa Posterior.....	58
4.1.	Análise dos dados clínicos e associação com subgrupos moleculares	68
6.	DISCUSSÃO	74
7.	CONCLUSÕES	83
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
	ANEXOS	98

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Ependimomas (EPNs) são tumores primários do sistema nervoso central (SNC) originado em células ependimárias que revestem o sistema ventricular, o canal central e o filo terminal da medula (LOUIS et al., 2016; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016). Dessa forma, este tumor pode estar distribuído tanto no compartimento intracraniano, como também, na região intramedular (MCGUIRE; SAINANI; FISHER, 2009; RAGHUNATHAN et al., 2013). Embora o EPN acometa todas as faixas etárias, há uma alta incidência na população pediátrica, sendo o terceiro tumor do SNC mais frequente na infância, correspondendo a aproximadamente 6 a 12% desses tumores pediátricos (MODENA et al., 2006; KILDAY et al., 2009; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016).

O tratamento inicial desta neoplasia consiste em ressecção cirúrgica seguida por radioterapia, embora este padrão de tratamento não seja uniforme e o impacto dos tratamentos adjuvantes como radioterapia e quimioterapia permaneçam conflitantes (MERCHANT et al., 2009; MERCHANT, 2017). Apesar dos avanços terapêuticos, 40% dos pacientes vão a óbito, mediante resistência às terapias e recorrência do tumor, a última ocorrendo em 50% dos pacientes, mesmo após ressecção cirúrgica total e radioterapia adjuvante (SOWAR et al., 2006; KILDAY et al., 2009; KORSHUNOV et al., 2010; GATTA et al., 2014).

Essa resistência às terapias atuais e os altos índices de recorrência local ocorrem devido à alta heterogeneidade dos tumores ependimários e à baixa concordância entre o diagnóstico histológico com o prognóstico observado clinicamente. Nesse contexto, descobertas recentes utilizando análises de expressão gênica e perfis de metilação revelaram que os EPNs de diferentes compartimentos anatômicos, apesar de apresentarem semelhanças histopatológicas, possuem assinaturas moleculares únicas (PALM et al., 2009; PAJTLER et al., 2015; PAJTLER et al., 2017). Com base nessas características moleculares, o EPN foi classificado por Pajtler e colaboradores (2015) em nove subgrupos moleculares distintos. Embora, haja significativa associação destes perfis moleculares com o desfecho prognóstico, nenhum marcador imuno-histoquímico ou molecular são aplicados na rotina clínica (PAJTLER et al., 2017). Assim, a utilização da classificação molecular, principalmente, nos casos de EPNs pediátricos em nossos serviços hospitalares, certamente, contribuirá para o estabelecimento de

diagnósticos mais precisos e terapias mais adequadas. Ademais, esta classificação em amostras de EPNs pediátricos brasileiros, realizada pela primeira vez em uma coorte brasileira, servirá como parâmetro comparativo do perfil molecular dos nossos pacientes com dados de outras casuísticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ependimoma

Os EPNs são tumores primários do SNC, originados a partir de células gliais endimárias que revestem o epitélio do sistema ventricular, do canal central da medula e do filo terminal (LOUIS et al., 2016; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016). Além disso, o EPN pode ser encontrado no parênquima cerebral como resultado de células endimárias fetais que migraram para áreas periventriculares (RENI et al., 2007). Contudo, Taylor e colaboradores (2005) sugerem que as células tronco gliais sejam as células de origem deste tumor.

A distribuição dos EPNs pode ser tanto no compartimento intracraniano, representados pelo EPN supratentorial, surgindo na linha média ou nos ventrículos laterais, mas podem ser superficialmente deslocados, dificultando sua localização no momento da cirurgia; e pelo EPN infratentorial ou de fossa posterior, comumente, encontrados no IV ventrículo, embora possam se estender através do ventrículo lateral ou médio, caracterizando massas laterais à região de fossa posterior. Os EPNs da região intramedular são denominados de EPNs medulares, caracterizadas por massas intramedulares, frequentemente, associadas a cistos (HAMILTON & POLLACK, 1997; MCGUIRE; SAINANI; FISHER, 2009; RAGHUNATHAN et al., 2013). EPNs extra craniais e extra medulares são extremamente raros, podendo estar presentes no mediastino, pulmão, ovário e região sacrococcígeo, sendo a última localização mais comum entre os EPNs que surgem fora do SNC (KILDAY et al., 2009; KATZ et al., 2018).

O EPN é um tumor localmente agressivo, com discreto potencial de se disseminar por todo o SNC, e metástases à distância ocorre em até 10% dos casos e cerca de 50% dos pacientes sofrerão por recorrências locais, mesmo após ressecção cirúrgica total e radioterapia adjuvante (SOWAR et al., 2006; KILDAY et al., 2009; KORSHUNOV et al., 2010; WRIGHT & GAJJAR et al., 2012; GATTA et al., 2014; MERCHANT et al., 2017). De um modo geral, a sobrevida de um paciente pediátrico de EPN é desanimadora com taxas de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de eventos (SLE) de 50 a 85% e 23% a 70%, respectivamente (ZACHAROULIS et al., 2010).

2.2. Dados epidemiológicos

Os EPNs desenvolvem-se em todas as faixas etárias, porém são raros em adultos e mais frequentes na população pediátrica, com características morfológicas e comportamento biológico muito variáveis de acordo com a idade (WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016). Sendo assim, compreende quase 2% de todos os tumores pediátricos e é o terceiro tumor do SNC mais comum em crianças, representando cerca de 6 a 12%, atrás apenas do astrocitoma e do meduloblastoma (MODENA et al., 2006; KILDAY et al., 2009; ANDREIUOLO et al., 2013; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016; SATO et al., 2017). A maior parte dos casos são diagnosticados em crianças menores do que 3 anos, abrangendo mais do que 30% dos tumores do SNC nessa faixa etária e, que geralmente, apresentam um pior prognóstico, com SG em 10 anos entre 30% a 70% (KILDAY et al., 2009; MCGUIRE et al., 2009; PAJTLER et al., 2018).

Dentre os EPNs pediátricos, 90% desenvolvem-se no compartimento intracraniano, sendo um terço localizado na região supratentorial e dois terços na região infratentorial ou de fossa posterior (LEE et al., 2016). Os tumores infratentoriais são mais frequentes em crianças jovens, enquanto que os EPNs supratentoriais comumente ocorrem em crianças mais velhas e adultos (KILDAY et al., 2009; GILBERT; RUDA; SOFFIETTI, 2010). Em adultos, os EPNs representam menos do que 4% dos tumores do SNC, dentre esses, 60% desenvolvem-se na medula espinhal, sendo esta uma localização rara em crianças (ARMSTRONG et al., 2010; GILBERT; RUDA; SOFFIETTI, 2010).

No Brasil, há poucos dados epidemiológicos descritos a respeito deste tumor. Em um estudo liderado por Lima et al. (2015) calcularam que dentre as 10 amostras analisadas de EPN, a probabilidade de SG em 5 anos seria de 53%. Em outra casuística de Curitiba-PR, os casos diagnosticados de EPN corresponderam a 3% das neoplasias neuroepiteliais do SNC e dentre esses 17,5% eram EPNs anaplásicos, sendo estes prevalentes na primeira década de vida, com distribuição de gênero de 1,63: 1 (mulheres:homens) e de evolução mais rápida, quando comparado aos demais subtipos histológicos. Além disso, esses casos de EPN foram encontrados em todas as faixas etárias, entretanto, com uma distribuição bimodal: um pico nas primeiras duas décadas e outro entre 30 a 40 anos (TORRES et al., 1999). De Andrade e colaboradores (2015) também identificou em uma

casuística brasileira que 90% dos EPNs pediátricos foram intracranianos, sendo a maioria desses casos diagnosticados como anaplásicos, enquanto que cerca de 70% dos pacientes adultos manifestaram EPNs medulares, indo de encontro aos dados gerais descritos na literatura.

2.3. Características e Subtipos Histológicos

Morfologicamente, os endimócitos normais se assemelham às células endimárias tumorais, exibindo complexos de zônulas de adesão bem desenvolvidos, filamentos gliais citoplasmáticos, microvilos e cílios. Assumem também, frequentemente, microlúmen intracelular, contendo microvilos, cílios e material proteico (LEHMAN et al., 2008). Em 1863-1865, Virchow foi o primeiro a reportar os tumores endimários. Logo mais, em 1889, Störch descreveu as pseudorosetas perivascularas e rosetas endimárias, que até os dias atuais permanecem como importantes critérios histológicos para o diagnóstico deste tumor, porém não são encontradas em todos os casos. As rosetas endimárias são compostas por células colunares em torno de um canal central e as pseudorosetas perivascularas, constituídas por células neoplásicas circunjacentes aos vasos sanguíneos (LOUIS et al., 2007; LEHMAN et al., 2008; RAGHUNATHAN et al., 2013; ANDREIOULO et al. 2013; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016; DE et al., 2018).

Com relação ao imunofenótipo dos EPNs, tipicamente, evidencia-se a expressão focal para o antígeno *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), particularmente em pseudorosetas e em lesões de grau histológico II e III. Outros antígenos frequentemente imunopositivos incluem o *S-100*, vimentina, CD99, *nestin* e *neural cell adhesion molecule* (NCAM). EPNs também são caracterizados por marcação positiva do *epithelial membrane antigen* (EMA) e em alguns casos, expressão de focos de citoqueratina, tais como AE1/AE3, CK7, CK18 e CK22. O *oligodendrocyte transcription factor* (OLIG2) está, normalmente, ausente, contudo presente em alguns núcleos de células tumorais, podendo ser um marcador útil no diagnóstico diferencial de outros tumores gliais, como oligodendroglioma ou astrocitoma pilocítico (RENI et al., 2007; LEHMAN et al., 2008; ANDREIOULO et al., 2013; LOUIS et al., 2016).

2.3.1. Classificação Histopatológica

Histologicamente, de acordo com a classificação de tumores do SNC da Organização Mundial da Saúde (OMS), o EPN é classificado em três graus de malignidade e em quatro variantes histológicas: subependimoma (grau I), EPN mixopapilar (grau I), EPN grau II e EPN grau III (anaplásico) (LOUIS et al., 2016). Esta classificação baseia-se no grau de variabilidade do pleomorfismo celular, taxa de mitoses, densidade celular, necrose tumoral e no nível de infiltração/invasão do tumor. Na 4ª edição, a mais atualizada da OMS (2016), pela primeira vez, houve a incorporação de uma variante molecular supratentorial: EPN, *v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (RELA)* positivo (grau II e grau III), descrita adiante com maior detalhes (ARMSTRONG et al., 2010; ELLISON et al., 2011; RAGHUNATHAN et al., 2013; LOUIS et al., 2016). As quatro principais variantes histológicas são denominadas de: celular, papilar, células claras e tanicítico. Raras variantes incluem os EPNs lipomatosos, vacuolados, melanocíticos, células gigantes e ependimomas com diferenciação óssea ou cartilaginosa (LEHMAN, 2008).

2.3.1.1. Subependimoma (Grau I)

O subependimoma é considerado benigno, de crescimento lento e prognóstico favorável e, frequentemente, curável com ressecção cirúrgica completa (KURIAN et al., 2007; LEHMAN et al., 2008). Microscopicamente, apresenta núcleo isomórfico, zonas de densa matriz fibrilar com recorrentes microcistos e, baixo índice mitótico ou em alguns casos ausente (RENI et al., 2007). É um subtipo predominante em adultos, sendo raros em crianças e que pode se instalar, principalmente, no IV ventrículo ou ventrículos laterais, e de forma ocasional na região medular (JAIN et al., 2012; ANDREIOULO et al., 2013).

2.3.1.2. Ependimoma mixopapilar (Grau I)

Esse subtipo histológico é também caracterizado por lesões de crescimento lento, compostas por células tumorais cuboides, com estruturas pseudopapilares,

material mucoide circundando o tumor e áreas ricas em colágeno (RENI et al., 2007; LEHMAN et al., 2008; PAJTLER et al., 2018). O EPN mixopapilar restringe à região medular, próximo ao cone medular, cauda equina e filo terminal, sendo raro em crianças. Todavia, quando ocorre são mais agressivos e tendem a se disseminar para o fluído cerebrospinal (FASSET et al., 2005; ANDREIOULO et al., 2013).

2.3.1.3. *Ependimoma clássico (Grau II)*

As principais características dos tumores de grau II também denominados de ependimomas clássicos incluem a presença de pseudorosetas perivasculares, bem como rosetas verdadeiras (LEHMAN, 2008; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016; PAJTLER et al., 2018). Além disso, apresentam moderada celularidade, mitoses raras ou ausentes, ausência de proliferação vascular e necrose (RENI et al., 2007; KATHUA et al., 2017).

2.3.1.4. *Ependimoma anaplásico (Grau III)*

São tumores com alta celularidade, pleomorfismo celular e nuclear, necrose, proliferação endotelial e frequentes mitoses, sendo este último um importante critério diagnóstico. As rosetas perivasculares também são características de destaque para este subgrupo histológico (RENI et al., 2007; LEHMAN et al., 2008; PAJTLER et al., 2018).

Apesar do uso desta classificação na rotina clínica, as semelhanças histopatológicas entre os EPNs de grau II e grau III e a ausência de critérios claramente estabelecidos entre os patologistas dificultam suas distinções e assim a estratificação baseada nesse fator prognóstico é insegura (YAO et al., 2011). Adicionalmente, é comum os EPNs apresentarem áreas isoladas com mais de uma variante histológica dentro de uma mesma lesão (ELLISON et al., 2011; PAJTLER et al., 2015). Além disso, tumores do mesmo tipo histológico, geralmente exibem comportamentos clínicos variáveis, com uma relação, em muitos casos controversa entre o diagnóstico histológico e o prognóstico clínico (YAO et al., 2011; JUNG et al., 2018). Essa alta heterogeneidade dos EPNs e a ausência de critérios histológicos bem estabelecidos dificultam o diagnóstico diferencial. Por isso, o grau histológico

nem sempre é considerado um fator prognóstico em EPNs, permanecendo insuficiente para a atribuição de uma estratificação de risco adequada (ZACHAROULIS et al., 2010; ELLISON et al., 2011; GODFRAIND et al., 2012; PAJTLER et al., 2015; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016; PAJTLER et al., 2017). Nesse sentido, estudos têm demonstrado a existência de entidades moleculares distintas em lesões tumorais de um mesmo compartimento anatômico (TAYLOR et al., 2005; JOHNSON et al., 2010; WITT et al., 2011). Diante dessas informações, torna-se imperativo que as decisões terapêuticas do EPN não sejam baseadas apenas no grau histológico e sim associadas às características moleculares. Uma vez que, já foi demonstrado que o subgrupo molecular juntamente com o nível de ressecção cirúrgica têm sido utilizados como parâmetros independentes para o prognóstico de tumores endodimários (PAJTLER et al., 2015; PAJTLER et al., 2017).

2.4. Classificação Molecular

Atualmente, a classificação molecular superou o grau histopatológico em relação às associações clínicas, indicando que decisões de tratamento mais eficazes poderiam ser tomadas com base na estratificação de risco molecular (PAJTLER et al., 2017; JUNG et al., 2018; MALGULWAR et al., 2018). Um dos subgrupos moleculares já foi reconhecido como uma entidade biologicamente e clinicamente distinta e análises histomoleculares integradas de tumores endodimários citam que a 5ª edição da classificação de tumores do SNC da OMS, certamente, incluirá mais entidades moleculares (PAJTLER et al. 2017).

Ademais, como trata-se de uma doença rara, os estudos clínicos são baseados em pequenas coortes de pacientes, portanto de difícil estudo e interpretação da sua biologia (GODFRAIND et al., 2012). Contudo, recentemente, com a era molecular, recentes avanços utilizando análises de expressão gênica, perfis de metilação e do número de cópias de DNA, revelaram que os EPNs de diferentes compartimentos anatômicos, apesar de apresentarem semelhanças histopatológicas, possuem assinaturas moleculares únicas (PALM et al., 2009). Com base nessas características moleculares, o EPN foi classificado por Pajtler e colaboradores (2015) em nove subgrupos moleculares distintos, sendo três subgrupos para cada compartimento anatômico (Figura 1).

Os subependimomas estão presentes em todos os 3 compartimentos anatômicos, predominam genomas estáveis e são vistos quase que exclusivamente em adultos. Apresentam maior similaridade com as características histopatológicas e de prognóstico favorável (PAJTLER et al., 2015).

Figura 1- Classificação molecular do EPN de todos os compartimentos anatômicos em graus histológicos, grupos etários e estratificação de risco. Adaptado de Pajtler et al., 2015.

2.4.1. Ependimoma de Fossa Posterior (EPN-FP)

Os EPNs localizados na fossa posterior (FP) podem ser classificados molecularmente em subependimoma, Grupo A ou Grupo B. Os dois últimos grupos (A e B) foram identificados através de um perfil transcricional por Witt e colaboradores como sendo molecularmente e clinicamente distintos. Os EPNs do Grupo A ocorrem com maior frequência em crianças (média de idade de 2,5 anos), com predominância de 70% no sexo masculino. Aproximadamente, 11% dos pacientes adultos são categorizados como EPNs FP Grupo A. Devido a predominante localização lateral ao cerebelo (67%) são frequentemente difíceis de ressecção cirúrgica completa e assim são associados a altas taxas de recorrência. Em sua maioria são categorizados como grau III (OMS) e, desse modo associados a um prognóstico desfavorável, com taxas de SG e SLE em 5 anos de 69% e 47% respectivamente (WITT et al., 2011, WANI et al., 2012). Por outro lado, o grupo de EPNs de fossa posterior que se agruparam com EPNs medulares neste estudo

foram denominados de Grupo B, ocorrendo em jovens ou adultos (média de idade de 20 anos), com cerca de 95% dos casos se apresentando na linha média cerebelar, o que facilita a resseção cirúrgica total e assim é visto um prognóstico mais favorável quando comparado ao Grupo A, com taxas de SG de 95% e SLE de 79% (WITT et al., 2011).

O EPN Grupo A mostra um perfil gênomico relativamente balanceado, com aumento da ocorrência do ganho do cromossomo 1q, fortemente associado com a reativação da telomerase e em menor frequência à perda da região 6q e ganho de 9q (WITT et al., 2011; GOJO et al., 2017). Em contraste, EPNs Grupo B exibem diversas anormalidades citogenéticas, envolvendo cromossomos inteiros ou braços de cromossomos como perda do cromossomo 1, 2, 3, 6, 8, 10, 14q, 17q e 22q e ganho do 4, 5q, 7, 9, 11, 12, 15q, 18, 20 e 21q. No que diz respeito as vias de sinalizações, o Grupo A é caracterizado por diversas vias relacionadas ao câncer, a exemplo de vias de angiogênese: *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1 α), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e migração celular; via *platelet-derived growth factor* (PDGF); *mitogen activated protein kinase* (MAPK); *epidermal growth factor receptor* (EGFR); *transforming growth factor beta* (TGF- β); sinalização de integrinas, de matriz celular, vias de receptores tirosina-quinases e sinalização *rat sarcoma virus*- RAS/GTPase. Enquanto que o Grupo B é definido por enriquecimento de vias envolvidas na ciliogênese/montagem de microtubúlos e mitocôndria/ metabolismo oxidativo (WITT et al., 2011; PAJTLER et al., 2015).

Dentre os genes subgrupos-específicos destacam-se o *laminin alpha-2* (LAMA2), gene que codifica uma proteína de matriz extracelular e *neural epidermal growth factor like-2* (NELL2), gene responsável pela expressão da proteína enriquecida em tecido neural, identificados como hiperexpressos no Grupo A e B, respectivamente (AIHARA et al., 2003; WITT et al., 2011; LATHIA et al., 2012; WANI et al., 2012; ZAKRZEWSKA et al., 2018; HOFFMAN et al., 2014). Uma posterior validação desse perfil transcricional por imuno-histoquímica (IHQ), confirmou que amostras do Grupo A tinha uma perfil de LAMA2 positivo e NELL2 negativo, enquanto que a maioria dos tumores do Grupo B possuem imuno-marcação oposta (WITT et al., 2011). A classificação desses dois subgrupos de fossa posterior utilizando esse perfil de expressão gênica LAMA2/NELL2 foram confirmados por dois outros grupos de pesquisa (WANI et al., 2012; HOFFMAN et al., 2014; ZAKRZEWSKA et al., 2016), indicando que a expressão gênica e ou/ proteica de

LAMA2 e NELL2 possam ser implementados como marcadores para separação desses dois subgrupos na rotina clínica. No entanto, nenhum estudo validou os subgrupos obtidos por IHQ utilizando esses marcadores em outras metodologias (NOBUSAWA; HIRATO & YOKOO, 2014). Adicionalmente, a alta expressão da proteína Tenascina-C (TNC), componente da matriz glicoproteica, têm sido demonstrado em EPNs pediátricos e associado a sinalização de matriz extracelular (KORSHUNOV et al., 2002; PUGET et al., 2009). Witt e colaboradores também mostraram, por IHQ, que a expressão positiva da TNC é mais elevada em pacientes do Grupo A (94%) do que do Grupo B (11%). Em conjunto com o ganho do cromossomo 1q, a elevada expressão proteica de TNC em EPNs de fossa posterior são considerados marcadores de pior prognóstico (GODFRAIND et al., 2012; KILDAY et al., 2012; ARAKI et al., 2016; ANDREIOULO et al., 2017).

Apesar de não haver mutações genéticas recorrentes no EPN Grupo A, estes demonstram hipermetilção de ilhas dinucleotídicas de citosina guanina (CpG) e hipometilação global do DNA. Portanto, o Grupo A foi referido como *CpG island methylator phenotype* (CIMP) positivo, enquanto que o Grupo B foram citados como CIMP negativos. De forma notável foi demonstrado que EPNs de fossa posterior Grupo A apresentam uma redução na metilação do DNA devido à perda de marcas metiladas na *histone H3 lysine 27* (H3K27), sendo um forte fator molecular deste subgrupo (MACK et al., 2014)

Recentemente, um estudo compreendendo 675 amostras de EPN-FP Grupo A, através de um perfil de metilação do DNA, identificou uma elevada heterogeneidade deste subgrupo, principalmente no que se refere a histogênese. A partir disso, foi identificado dois principais subgrupos, denominados PFA-1 e PFA-2, contendo nove subtipos, seis para o subgrupo PFA-1 (PFA-1a; PFA-1b; PFA-1c; PFA-1d; PFA-1e e PFA-1f) e três pertencentes ao PFA-2 (PFA-2a; PFA-2b e PFA-2c) (PAJTLER et al., 2018). Estes nove subtipos diferem quanto a idade ao diagnóstico, sexo, desfecho clínico e características moleculares. Na casuística analisada, o PFA-1 foi mais abundante, correspondendo a 69% e o restante (31%) ao grupo PFA-2. Os subtipos PFA-1c, PFA-1d e PFA-1e foram associados a índices ruins de SG e SLE em 10 anos correspondendo a 16% e 22%, respectivamente. Dentre as características genéticas peculiares de cada subtipo, encontra-se predominância de ganho de 1q para o subtipo PFA-1c e prognóstico clínico relativamente ruim. O tumores PFA-2c, em contrapartida, são considerado de bom

prognóstico e expressam altos níveis do gene *orthodenticle homeobox 2* (OTX2), mostrando ser um biomarcador desse subtipo de EPN FP, com SG em 5 anos acima de 90%. Neste estudo, também evidenciou uma importante característica dos EPNs FP que são mutações recorrentes na H3K27 e que acomete preferencialmente PFA-1, tal fato não havia sido identificado no trabalho de Mack et al. 2014.

2.4.2. Ependimoma Supratentorial (EPN-ST)

Os EPNs Supratentoriais são classificados em subependimoma, fusão *YAP1* e fusão *RELA*. Os subgrupos *YAP1* e *RELA* são mais frequentes em crianças, média de idade de 1,4 anos e 8 anos, respectivamente. Embora os tumores EPN-ST *RELA* possam ocorrer, comumente, em adultos. Ambos, se caracterizam por rearranjos no cromossomo 11, representados, respectivamente, pelas fusões que ocorrem entre o proto-oncogene *RELA*, do tipo *C11orf95-RELA* e fusão envolvendo o locus gênico *yes-associado a proteína 1* (*YAP1*), descritas dois tipos: *YAP1-MAMLD1* ou *YAP1-FAM118B* (PARKER et al., 2014; PAJTLER et al., 2015).

Mais de 70% dos EPNs supratentoriais são caracterizados pela fusão *RELA*, formada a partir de rearranjos intra e intercromossômicos no cromossomo 11q12.1-13.3, consistentes com *chromothripsis* entre os genes *chromosome 11 open reading frame 95* (*C11orf95*), um gene com papel fisiológico desconhecido e o gene *RELA* que codifica a subunidade efetora p65 da via de sinalização *nuclear factor-Kappa B* (NF-kB), regulando muitos processos fisiológicos, incluindo inflamação, respostas imunes e morte celular (PARKER et al., 2014; PAJTLER et al., 2015). No contexto tumoral, a ativação constitutiva da via NF-kB está presente em muitos tumores, modulando diversos genes-alvo da progressão tumoral, a exemplo de controladores da proliferação celular, apoptose, como também da vascularização tumoral (KARIN, 2009). O gene *C11orf95* codifica uma proteína hipotética de 678 aminoácidos de função desconhecida, mas que exibe expressão em uma ampla variedade de tecidos humanos (OTA et al., 2004). Este gene também mostrou estar fusionado com outros genes em EPN, caracterizando duas outras fusões: *C11orf95-YAP1* e *C11orf95-MAML2* (PARKER et al., 2014). Huang e colaboradores (2010) identificou uma translocação recíproca t(11;16)(q13;p13) em lipomas condroides

envolvendo o gene *C11orf95* e que resulta em uma quimera oncogênica: *C11orf95-MKL2*.

De acordo com dados de Parker et al. (2014) foram identificados sete transcritos distintos da fusão *RELA* em EPNs, todas com capacidade para induzir tumorigênese (FIGURA 2A). A fusão mais frequente (63%) envolve o éxon 1 a 2 de *C11orf95* e éxon 2 de *RELA* (*RELA* tipo 1), seguida pela fusão tipo 2 (38%) que inclui éxon 1 a 3 de *C11orf95* e éxon 2 de *RELA*. Para ambas as fusões, a porção *RELA* não inclui os primeiros códons (PAJTLER et al. 2015). Análises de *Western blot* mostraram que proteínas derivadas destas fusões se acumulam preferencialmente no núcleo e ativam a transcrição da via NF-KB (PARKER et al., 2014). Além disso, EPNs-ST que carregam a fusão *RELA* mostram uma regulação positiva de RNA mensageiro (RNAm) de *RELA*, em contraste, EPNs-ST fusão *RELA* negativos, EPNs de fossa posterior e medulares, endimoblastomas, pineoblastomas, meduloblastomas e cerebelos fetais não apresentaram essa hiperexpressão gênica de *RELA* (MALGULWAR et al., 2018). Por IHQ, utilizando anticorpo específico para proteína *RELA*, também evidenciou que casos positivos *RELA* exibiam forte marcação citoplasmática e nuclear, a última indicando sinalização NF-KB ativa (PIETSH et al., 2014). Outra molécula pertinente à translocação da fusão *C11orf95-RELA* é *L1 cell adhesion molecule* (L1CAM), proposta como sendo um marcador para o diagnóstico desse subgrupo molecular (ELLISON et al., 2011; PARKER et al., 2014; PIETSH et al., 2014; CACHIA et al., 2015; LOUIS et al., 2016; GESSI et al., 2017; MALGULWAR et al., 2017).

A fusão *C11orf95-RELA* está associada a um pior prognóstico com elevados índices de recorrência local e com taxas de SG e SLE em 10 anos de 50% e 20%, respectivamente (PAJTLER et al., 2015). A caracterização genética de EPNs-ST ainda está em evolução e fusões envolvendo diferentes genes e *lôcus* tem sido reportados, tal como *C11orf95-NCOA1* (PIETSH et al., 2014), *KTN1-ALK*, *CCDC88A-ALK* (OLSEN et al., 2016).

O prognóstico desfavorável nesse subgrupo também está associado à perda do cromossomo 9p, e consequente deleção homozigota do gene inibidor de *cyclin dependent kinase 2a* (*CDKN2A*) (KORSHUNOV et al., 2010; WITT et al., 2011). Genes do ciclo celular, de migração celular e genes também estão envolvidos na sinalização *mitogen activated protein kinases* (MAPK) são mais ativos nos tumores fusão *RELA*, embora também sejam ativos em tumores EPN de fossa posterior

Grupo A (PAJTLER et al., 2015). Recentemente, outras vias foram identificadas neste subgrupo como o *polycomb repressor complex 1* (PRC1) e *histone deacetylase 4* (HDAC4) (MACK, PAJTLER & CHAVEZ et al., 2017).

Os EPNs fusão *YAP1* possuem fusões recorrentes envolvendo os éxons 1-5 ou 1-6 do gene *YAP1*, efetor negativo *downstream* da via de sinalização Hippo, que por sua vez está relacionada à supressão tumoral por restringir a proliferação celular e promover apoptose) e os éxons 2-7 ou 3-7 do gene *mastermind like domain containing 1* (*MAMLD1*), membro da família de genes *mastermind*, os quais são coativadores transcricionais da via Notch (Figura 2B). Em menor frequência, observa-se a fusão entre os éxons de 1-7 do gene *YAP1* e éxons de 3-9 do gene *family with sequence similarity 118 member B* (*FAM118B*) envolvido na biogênese de pequenas ribonucleoproteínas nucleares, estas associadas a proliferação celular e metabolismo ativo (Figura 2C) (LI et al., 2014). Importantes características são que ambas as proteínas da fusão *YAP1-MAMLD1* detêm a maioria dos domínios N-terminais da proteína *YAP1*, bem como as porções C-terminais de *MAMLD1* (PAJTLER et al., 2015).

O gene *YAP1* em carcinomas nasofaríngeos origina fusões semelhantes a deste subgrupo, com o gene *mastermind-like protein 2* (*MAML2*), pertencendo também da família de genes *mastermind* (VALOUEV et al., 2014). Além disso, Tremblay et al. (2014) mostrou que a alta atividade de *YAP1* é suficiente para induzir rabdomiossarcoma embrionário. Enquanto que, o gene *FAM118B* parece ter funções similares, porém ainda pouco esclarecidas. Um estudo recente mostrou que o silenciamento de *FAM118B* resultou na diminuição da proliferação celular na linhagem tumoral derivada de cólon-uterino, HELA (LI et al., 2014).

Em relação as vias de sinalização ativas neste subgrupo, destacam-se vias do metabolismo de adenosina *3'-5'-cyclic adenosine monophosphate* (cAMP)/carboidratos e genes da via da dopamina. Os pacientes do subgrupo *YAP1* exibem prognóstico favorável, com taxas de sobrevida próximas a 100% (PAJTLER et al., 2015). Pacientes do subgrupo *YAP1* são considerados de bom prognóstico, com SG em 10 anos de 100%. Porém, a falta de modelos adequados de estudo para *EPN-ST-YAP1* dificulta o desdobramento da biologia dos tumores que compõe este subgrupo (PAJTLER et al., 2015). A fusão *C11orf95-RELA* e *YAP1* não foram detectadas em nenhum tumores de fossa posterior (PARKER et al., 2014; PAJTLER et al., 2015).

Figura 2- Transcritos e proteínas dos subtipos da fusão *RELA*, fusão *YAP1-MAM* e fusão *YAP1-FAM*. **A)** Sete subtipos da fusão *RELA*, descritos por Parker et al., 2014, demonstrando distintos pontos de quebra e seus respectivos produtos proteicos preditos, com preservação do domínio *zinc finger* do gene *C11orf95* (em azul); **B)** Pontos de quebra distintos da fusão envolvendo o gene *YAP1* e *MAMLD1*, ambas proteínas preditas preservam o domínio de ligação a *TEAD*; **C)** Ponto de quebra da fusão *YAP1-FAM118B*, também contendo o domínio de ligação ao fator *TEAD*. Os domínios das proteínas são indicados na legenda abaixo.

2.4.3. Ependimoma Medular (EPN-ME)

Os subgrupos do compartimento medular afetam quase que, exclusivamente, adultos e são os únicos que apresentam uma concordância com a classificação histológica, sendo os EPNs medulares dos tipos subependimoma e mixopapilar caracterizados como grau I e os demais EPNs medulares (EPN-ME) com a classificação histológica de grau II ou grau III (KURIAN et al., 2008). Os pacientes com tumores ependimários medulares geralmente podem ser curados apenas com a ressecção cirúrgica total. Estes apresentam prognósticos favoráveis, com taxas de SG em 10 anos de 88% a 100% (PAJTLER et al., 2015).

O subgrupo medular subependimoma é caracterizado pela perda frequente do cromossomo 6q. O subgrupo mixopapilar e EPN-ME possuem outras alterações cromossômicas, no qual o evento mais frequente é a perda do cromossomo 22q, principalmente em tumores EPN-ME. A perda do 22q está associada à mutação do

gene neurofibrina 2 (*NF2*), comum em quase todos os tumores do EPN-ME. Interessantemente, devido a mutação no gene *NF2*, pacientes com neurofibromatose tipo 2 possuem predisposição ao desenvolvimento de tumores endimários (MARTUZA & ELDRIDGE, 1988; RUBIO et al., 1994). Além disso, é comum encontrar em todos os subgrupos de EPN medular diferenças na expressão de genes pertencentes à via de sinalização *homeobox* (*HOX*) que são essenciais para o desenvolvimento da coluna vertebral (TAYLOR et al., 2005). Esses tumores mostram o enriquecimento de genes envolvidos na angiogênese, coagulação sanguínea e vias *bone morphogenetic proteins* (*BMPs*) e EPN mixopapilar de maneira específica são definidos por um fenótipo *Warburg*, evidenciada pelo aumento da expressão de lactato (KATHUA et al., 2017).

2.5. TRATAMENTO

Embora muito já tenha sido alcançado em tratamentos de EPN, especificamente, nos casos pediátricos, o número de pacientes com recaída da doença ainda é grande, podendo haver recorrência local do tumor em até 50% dos casos (SOWAR et al., 2006; KILDAY et al., 2009). Adicionalmente, muitos pacientes menores do que 3 anos de idade desenvolvem sérias sequelas neurocognitivas, neuroendócrinas e efeitos neurológicos adversos decorrentes da radioterapia (WRIGHT & GAJJAR et al., 2012; PURDY et al., 2014). Desse modo, as novas estratégias são desafiadoras, especialmente para pacientes com tumores ressecados de forma parcial, metastáticos e/ou anaplásicos, bem como pacientes menores do que 3 anos (WRIGHT & GAJJAR et al., 2012; SATO et al., 2017).

O tratamento do EPN varia conforme a localização tumoral e o centro do tratamento, entretanto o pilar do tratamento contemporâneo consiste em ressecção cirúrgica, seguida por radioterapia adjuvante (MERCHANT; FOULADI, 2005).

A cirurgia representa o primeiro estágio de tratamento, fornecendo tecido para diagnóstico histológico e análise molecular, além de reestabelecer o fluxo do líquido cefalorraquidiano (LCR) (HEALEY et al., 1991; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016). Embora técnicas de ressonância magnética (RM) e tomografia computadorizada (TC), neurocirurgias estereotáxicas e cuidados intensivos no pós-operatório tenham contribuído para melhorias no resultado cirúrgico, algumas complicações podem ser vistas, incluindo paralisia de nervos cranianos e síndrome

da fossa posterior, dependendo da localização do tumor. Esta síndrome se apresenta com mutismo e paralisia pseudobulbar, geralmente relatada no pós-operatório de pacientes com EPN de fossa posterior (WRIGHT & GAJJAR et al., 2012). A ressecção cirúrgica radical é de suma importância, pois crianças com ressecção cirúrgica completa possuem maiores taxas de sobrevida (67% a 93% de SG em 5 anos) quando comparado a pacientes ressecção subtotal (22% a 52% de SG em 5 anos) (ZACHAROULIS et al., 2010).

Os resultados obtidos através do uso da radioterapia (RT) no pós operatório mostrou uma melhora significativa nas taxas de sobrevida em 5 anos para pacientes com EPN intracraniano de 0-27% para 36,5-87% comparado a pacientes que foram submetidos apenas à cirurgia (MORK & LOKEN, 1977; STÜBEN et al., 1997; SCHILD et al., 1998). O objetivo da radioterapia é erradicar a doença microscópica residual e a dose padrão de radiação para EPNs localizados é de 54 a 59,4 *grays* (Gy). Quando o tumor se encontra disseminado, recomenda-se irradiação espinal em torno de 36 Gy (PAULINO et al., 2010; GODFRAIND et al., 2012). No entanto, a dosagem de radiação e o campo de radiação, focal ou em todo cérebro, permanece em debate (TAYLOR et al., 2004).

Assim, há um consenso de que a radioterapia faz parte do tratamento padrão para pacientes com EPN grau III (anaplásicos) ou EPNs de baixo grau que não podem sofrer ressecção completa. No entanto, não há estudos pré-clínicos que testam o benefício da radioterapia na sobrevida de pacientes de grau II submetidos a ressecção completa (ELLISON et al., 2011; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016). A radioterapia adjuvante é aplicada em crianças acima de até 3 anos de idade como uma estratégia para estender a sobrevida dessas crianças, sendo que para pacientes menores que essa faixa-etária recomenda-se radioterapia de campo envolvido conformacional, no entanto o efeito a longo prazo dessa abordagem ainda é desconhecida (MERCHANT; FOULADI, 2005; KORSHUNOV et al., 2010; SATO et al., 2017; PAJTLER et al., 2017).

A quimioterapia, por sua vez, têm sido utilizada em diversos protocolos de tratamento, principalmente em crianças menores de 3 anos na tentativa de adiar ou evitar a radiação e assim não comprometer o desenvolvimento do SNC, mas seu efeito ainda não demonstra benefícios claros na sobrevida de muitos pacientes (DUFFNER et al., 1993; SOUWEIDANE; BOUFFET & FINLAY, 1998; MERCHANT; FOULADI, 2005; MODENA et al., 2006; MERCHANT et al., 2008). E até o momento

não há agentes quimioterápicos que podem ser rotineiramente recomendados (JUNG et al., 2018).

A maioria dos estudos são retrospectivos, e regimes de quimioterapia baseados em Cisplatina têm sido empregados e parecem resultar em melhor resposta clínica, porém sem prolongar a SG e ou SLE (BRANDES et al., 2005). A temozolomida (TMZ), tratamento padrão para muitos tumores do SNC, apresentou eficácia em pacientes com EPN intracranianos recorrentes refratários à Cisplatina, todavia os estudos que mostram avaliações retrospectivas em pacientes grau II e III de que receberam TMZ são limitados (CHAMBERLAIN & JOHNSTON, 2009; GRAMATZKI et al., 2016; RUDÀ et al., 2018). O bevacizumab, um anticorpo monoclonal que tem como alvo o VEGF têm sido explorado em um estudo retrospectivo em EPNs recorrentes, demonstrando progressão de 6,4 meses e mediana de SG de 9,4 meses (GREEN et al., 2009). Atualmente, o *Collaborative Ependymoma Research Network* (CERN) possui teste em fase pré-clínica II (NCT01295944) com bevacizumab e carboplatina em pacientes com EPN, o teste está em andamento, portanto não há resultados disponíveis.

O fracasso das atuais terapias podem ser justificadas por ainda tratar todos os casos como única doença, sem que haja uma estratificação de acordo com variáveis clínicas e características moleculares, não identificando com precisão o risco da doença. Neste contexto, a identificação de características de entidades moleculares únicas descritas acima, fornecem uma visão do desenvolvimento de ensaios clínicos alvo-dirigidos para alterações moleculares de EPNs e que podem ter um importante significado no prognóstico clínico (KORSHUNOV et al., 2010; ZACHAROULIS et al., 2010; WRIGHT & GAJJAR et al., 2012).

Sendo assim, em 2017 houve um consenso para o manejo clínico de EPNs levando em consideração a caracterização molecular (PAJTLER et al. 2017). Para o EPN FP Grupo A foi sugerido ressecção cirúrgica total seguida por radioterapia. Um estudo recente de Ramaswamy e colaboradores. (2016) demonstrou que quando é seguido este protocolo- ressecção cirúrgica radical e radioterapia de primeira linha- crianças deste subgrupo (FP Grupo A) têm melhores resultados. Já pacientes EPN FP Grupo B, apenas a cirurgia é suficiente para bons prognósticos, portanto, evitar a radiação e investir em estudos de terapias específicas para o Grupo B, melhoraria significativamente a qualidade desses pacientes a longo prazo. Além disso, como o Grupo A é caracterizado por níveis elevados de metilação do DNA, drogas que

modulam essa alteração epigenética, como inibidores de DNA metiltransferases ou de *enhancer zeste homolog 2* (EZH2) componente PRC2 são considerados potenciais agentes terapêuticos (MACK et al., 2014; RAMASWAMY et al., 2016). Nesse sentido, um estudo piloto usando o agente desmetilante, azacitina (5-Aza-2'-deoxycytidine) está em andamento (NCT02940483), por meio da infusão desse agente no IV ventrículo de crianças com EPN FP recorrente (MERCHANT et al., 2017).

Para EPNs ST *RELA* considerados de pior prognóstico ainda não há evidências que norteie o uso de diferentes tratamentos para esses pacientes deste (NAKAMURA et al., 2017; PAJTLER et al., 2017). Mas, acredita-se que a inibição de NF-KB seja um potencial alvo terapêutico nesse subgrupo, assim como inibidores de YAP1 para o subgrupo EPN ST *YAP1* (MACK & TAYLOR, 2017). Até o momento, não há nenhum consenso direcionado aos EPNs ST diagnósticos sem as fusões *RELA* e *YAP1*, e considera-se que melhores estudos sejam feitos nesse grupo de EPNs heterogêneos. Ademais, nesse consenso também foi acordado que os subgrupos moleculares fariam parte de todos os ensaios clínicos em andamento, enfatizando que a detecção de subgrupos moleculares e consequentemente a busca por alvos terapêuticos sejam de grande importância (PAJTLER et al., 2017).

2.6. FATORES PROGNÓSTICO

A identificação de fatores prognósticos em EPNs permanece controverso, pois estudos retrospectivos que abrangem várias décadas dificultam a interpretação dos resultados devido mudanças recorrentes na classificação e de abordagens terapêuticas, além do que a baixa incidência deste tumor exerce um poder estatístico limitado (RENI et al., 2007; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016). O fator prognóstico mais importante, atualmente é o grau de ressecção cirúrgico tumoral (ZACHAROULIS & MORENO, 2009; ARMSTRONG et al., 2012). Outras variáveis clínicas do EPN como grau histopatológico, idade e localização do tumor são importantes, apesar desses fatores permanecerem contraditórios (JUNG et al., 2018), reconhecendo que os fatores prognósticos para pacientes adultos possam ser diferentes (WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016).

O grau histopatológico tumoral não é universalmente aceito, devido a discrepâncias entre o diagnóstico patológico inicial e o que é relatado na revisão do laudo, mas principalmente, pelo fato de características de anaplasia não estarem relacionadas ao comportamento biológico dos EPNs (SCHIFFER et al., 1991; SCHIFFER et al., 1991; ELLISON et al., 2011; HOFFMAN et al., 2014; LOUIS et al., 2016). Análises de casos de EPN em uma única instituição encontraram que cerca de 20% deles haviam sido diagnosticados como outro tipo histológico de neoplasia antes da revisão por especialistas (ARMSTRONG et al., 2010). Para muitos autores o grau histológico é o mais importante fator prognóstico, em contrapartida outros não encontram qualquer associação entre a sobrevida e o grau histológico, sugerindo que isso seja influenciado muito mais pela localização anatômica, o que determina o grau de ressecção ao invés da histologia (WEST, BRUCE & DUFFNER, 1985; SALA et al., 1998; GUPTA & SALUNKE, 2017). A falta de correlação de EPNs grau I e II com desfechos clínicos, sugerem que características moleculares possam ter maior impacto na biologia tumoral e no prognóstico do que graus histológicos (RENI et al., 2004; WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016; PAJTLER et al., 2015; PAJTLER et al., 2017; MACK & TAYLOR et al., 2017).

Outro fator relevante é a idade, o qual uma correlação direta entre a idade e melhor prognóstico tem sido sugerida. Porém, a ampla diferença de idade máxima pediátrica definida entre os estudos (variando de 12 a 20 anos), a heterogeneidade do grau histológico e a localização tumoral entre os grupos de diferentes idades impedem conclusões confiáveis (PAULINO et al., 2000; RENI et al., 2007). No entanto, sabe-se que pacientes adultos possuem um prognóstico relativamente melhor, com sobrevida de 55% a 90% em comparação com pacientes pediátricos. Em geral quanto mais jovem for a criança, pior será seu prognóstico. Esse fato é sugerido, pois acredita-se que EPNs pediátricos possam se comportar de maneira mais agressiva devido ao tecido neural ser mais imaturo e dessa forma ser encontrado um perfil de aberrações genéticas diferente do que pacientes mais velhos (SALA et al., 1998; KORSHUNOV et al., 2000; HIROSE et al., 2001; TIHAN et al., 2008). A era pré-molecular torna a idade um importante fator prognóstico, principalmente para pacientes com EPN de fossa posterior, o qual os subgrupos moleculares nitidamente correlacionam com a idade diagnóstica. No entanto, o mau prognóstico do EPN FP Grupo A e o bom prognóstico do Grupo B, independem da idade (PAJTLER et al., 2015; RAMASWAMY et al., 2016).

O papel da localização tumoral também é controverso, pois alguns autores relatam que não há impacto dessa variável, enquanto outros relatam que os EPNs supratentoriais estão relacionados a pior prognóstico. Causadas pelas características de crescimento infiltrativo periférico no parênquima cerebral e menos frequentemente, encapsulado, tornando difícil a ressecção cirúrgica. Por outro lado, outros autores alegam que o pior prognóstico pertence aos EPNs de fossa posterior que ocorre em pacientes mais jovens, com potencial chances de invadir o tronco cerebral, o assoalho do IV ventrículo ou nervos cranianos e o ângulo cerebelopontino através do forame de Luschka, impedindo assim a ressecção completa. A sobrevida de 5 anos varia entre 35% e 76% para supratentorial, 40% e 59% para infratentorial, e 57% e 100% para ependimomas medulares (BRANDES et al., 2004; KORSHUNOV et al., 2004; TIHAN et al., 2008; ANDREIOULO et al., 2013).

A extensão da ressecção cirúrgica tem sido mais poderoso marcador de prognóstico, tanto para o controle local, como para a sobrevida, todavia, historicamente a ressecção total é possível em apenas metade dos pacientes (ROUSSEAU et al., 1994; POLLACK et al., 1995; HORN et al., 1999; KORSHUNOV et al., 2010; DE et al., 2018). A remoção total atinge uma melhor sobrevida em 5 anos do que um ressecção subtotal (ARMSTRONG et al., 2012; WRIGHT & GAJJAR, 2012; ANDREIOULO et al., 2013). No entanto, a maioria dos autores não conseguiu encontrar vantagem relacionada à extensão da ressecção. A falta de evidências para o impacto da cirurgia na sobrevida poderia estar relacionado à falta de confiabilidade da avaliação subjetiva do grau de ressecção cirúrgica. De forma interessante, não há relatos de que o grau de ressecção cirúrgica no subgrupo EPN ST RELA afete o prognóstico desses pacientes em uma análise retrospectiva (PAJTLER et al., 2017). Enquanto que no EPN FP Grupo A há evidências que a ressecção cirúrgica parcial altera negativamente a sobrevida (RAMASWAMY et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estabelecer e padronizar a classificação molecular em amostras de ependimomas pediátricos provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC/FMRP-USP), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FM-USP) e do Centro Infantil Boldrini-Campinas (CIB).

3.2. Objetivos Específicos

- Classificar amostras de EPN supratentorial através da identificação da presença/ausência de fusões *RELA* tipo 1 e 2 e fusões *YAP1*: *YAP1-MAMLD1* e *YAP1-FAM118B* por RT-PCR e sequenciamento de Sanger;
- Analisar a presença/ausência de fusões *RELA* tipos 1 e 2 e fusões *YAP1*: *YAP1-MAMLD1* e *YAP1-FAM118B* por RT-PCR e sequenciamento de Sanger em amostras de EPN de fossa posterior;
- Classificar amostras de EPN de fossa posterior nos subgrupos A e B por meio da técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpos *LAMA2*, *TNC* e *NELL2*;
- Avaliar a expressão gênica dos marcadores *LAMA2*, *TNC* e *NELL2* por qRT-PCR e correlacioná-la aos dados de expressão proteica obtidos nos casos de EPN de fossa posterior;
- Analisar a classificação molecular de acordo com parâmetros clínicos e biológicos dos pacientes/tumor (grau histológico, recidiva e tempo de sobrevida).

4 CASUÍTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Desenho Experimental

4.2. Casuística

Foram incluídos neste estudo 65 amostras para análise, sendo 47 tumores primários, dentre esses, 5 tumores primários possuíam sua respectiva recidiva e 18 amostras apenas a recidiva sendo a representativa do tumor, com diagnóstico de ependimoma grau II ou grau III seguindo os critérios da OMS (LOUIS et al., 2016). Todos os casos são provenientes dos três institutos vinculados ao Projeto Temático (2014/20341-0): Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC/FMRP-USP), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (HC/FM-USP) e Centro Infantil Boldrini-Campinas (CIB), com participação voluntária atestada em termo de consentimento pelos pacientes ou seus responsáveis legais. Todas as amostras tiveram os diagnósticos revisados e confirmados pelos Departamentos de Patologia das respectivas instituições e microdissecadas. Do total de amostras, 63 casos incluía fragmentos de tecido tumoral congelados e blocos de tecido incluídos em parafina e 2 amostras tinha-se apenas blocos de tecido incluídos em parafina.

No grupo de EPNs primários (n=47), foram avaliadas 17 amostras que pertenciam ao compartimento supratentorial, com três delas possuindo sua recidiva pareada e 30 casos da região de fossa posterior, duas dessas amostras com sua recidiva pareada. Dentre as amostras primárias, 26 do sexo feminino e 21 do sexo masculino, com uma média de idade no diagnóstico de 62,3 meses (mediana de 45,5 meses) variando de 6 a 164 meses. Em relação ao grau histológico, 26 amostras apresentaram grau II e 21 grau III. Sete amostras de tecido incluído em parafina de adultos foram analisadas, mas apenas 5 delas apresentavam fragmentos de tecido tumoral congelado.

O tempo livre de progressão foi considerado da data da cirurgia até a recorrência dos casos com ressecção cirúrgica completa ou até a data do recrescimento de lesão de ressecção cirúrgica subtotal. Considerou-se o tempo de sobrevida global como a data do diagnóstico até ao óbito ou a data do último seguimento. Para tumores pediátricos, a mediana do seguimento de evento (recidiva ou óbito) foi de 17 meses, variação de 1 a 148 meses. Enquanto que a mediana do seguimento do desfecho clínico (vivo ou óbito) foi igual a 35 meses, variação de 1 a 179 meses. Oito dos 47 tumores primários não foram incluídos na análise de

sobrevida livre de eventos e sobrevida global mediante a perda de seguimento ou dados indisponíveis.

No outro grupo de EPNs com amostras representativas de recidiva (n=18), nove referiam-se ao compartimento supratentorial e 9 à região de fossa posterior, oito amostras do sexo feminino e dez do sexo masculino, com grau histológico de 8 amostras grau II e 10 grau III, uma amostra foi excluída do parâmetro de histologia. Nove amostras de recidivas foram excluídas das análises de sobrevida, impossibilitando esse tipo de análise para esse grupo de amostras.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC/FMRP-USP, nº Proc. 15509/2016 (Anexo I); Banco de Tumores do Laboratório de Biologia Molecular do CIB (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp - reunião dia 17/02/09), e no Banco do Laboratório de Biologia Molecular FM-USP, coordenado pela Dra. Suely K. N. Marie. Foram obtidos termos de consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis.

Tabela 1- Dados clínicos referentes a idade, gênero, localização anatômica, grau histológico, grau de ressecção, tratamento, presença de recidiva e desfecho clínico (vivo ou óbito) dos pacientes incluídos no estudo (NA= não avaliado).

VARIÁVEL CLÍNICA	Nº PACIENTES (%)	
	Tumor primário	Recidiva
TOTAL	47 (72)	18 (28)
Idade		
≤3 anos	19 (40,4)	6 (33,3)
>3 anos	28 (59,6)	12 (66,7)
Gênero		
Feminino	26 (55,3)	8 (44,4)
Masculino	21 (44,7)	10 (55,6)
Localização anatômica		
Supratentorial	17 (36,2)	9 (50,0)
Fossa Posterior	30 (63,8)	9 (50,0)
Grau histológico		
Grau II	26 (55,3)	8 (44,4)
Grau III	21 (44,7)	10 (55,6)
Grau de ressecção		
Completa	31 (66,0)	9 (50,0)
Incompleta	15 (31,9)	9 (50,0)
NA	1 (2,1)	--
Tratamento		
Cirurgia	9 (19,1)	--
Radioterapia	7 (13,9)	5 (27,8)
Quimioterapia	11 (23,4)	4 (22,2)
Radio+ Químio	14 (29,8)	7 (38,9)
NA	6 (12,8)	2 (11,1)

VARIÁVEL CLÍNICA	Nº PACIENTES (%)	
	Tumor primário	Recidiva
TOTAL	47 (72)	18 (28)
Recidiva		
Sim	21 (44,7)	--
Não	23 (48,9)	--
NA	3 (6,4)	--
Óbito		
Sim	26 (55,3)	6 (33,3)
Não	16 (34,1)	9 (50,0)
NA	5 (10,6)	3 (16,7)

4.3. Extração de *RNA* e síntese de cDNA

Sessenta e três fragmentos de tecidos tumorais foram coletados imediatamente após o procedimento de ressecção cirúrgica, congelados e armazenados em nitrogênio líquido. Porções de tecidos não tumorais (tecido normal e/ou necrose) foram microdissecados por patologistas previamente à extração. O *RNA* total das amostras foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen Inc, Carlsbad, EUA) ou *AllPrep DNA/RNA/Protein* Mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as especificações dos fabricantes. As concentrações foram determinadas pela leitura de espectrofotômetro em comprimento de onda de 260/280nm no aparelho de *ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop 1000 Technologies, Wilmington, DE, EUA) e armazenados em freezer -80°C . Razões que variavam de 1,8 a 2,0 foram consideradas satisfatórias para grau de pureza do *RNA*. A reação de transcrição reversa para a síntese da fita de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 500 ng de *RNA* total por meio do kit *High Capacity* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

4.4. RT-PCR

Para classificação molecular das amostras de EPNs supratentoriais, os cDNAs foram submetidos à reação de cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) para identificar presença das fusões *RELA* tipos 1 e 2, *YAP1-MAMLD1* e *YAP1-FAM118B*. Além disso, este procedimento também foi realizado em 36 amostras de EPN fossa posterior para as fusões *RELA* tipo 1 e 2 e fusão *YAP1-MAMLD1* e em 24

amostras para fusão *YAP1-FAM118B*, incluindo tumor primário e recidiva, com a finalidade de avaliar se essas fusões são subgrupo específica.

Para realizar a RT-PCR (Volume final = 25µL), foram utilizados os reagentes na concentração final: 500ng de cDNA; 1X de tampão 10X; 0,75mM de MgCl₂; 0,2mM de dNTPs; 0,2mM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (*Platinum™ Taq DNA Polimerase*, Invitrogen, EUA). As sequências dos *primers* e condições das reações estão descritas nas tabelas 2 e 3. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2%, tendo como agente intercalante o brometo de etídio. A eletroforese procedeu-se com tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5X e o gel revelado em transiluminador de luz ultravioleta *Bio-Imaging Systems MiniBis Pro*. O padrão de tamanho do fragmento de DNA utilizado foi de 1kb (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, EUA).

Tabela 2 - Sequência dos *primers* e tamanho dos produtos de PCR (pares de base - pb), de acordo com os protocolos de Parker et al. (2014) e Pajtler et al. (2015).

Fusão gênica	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>	Produto de PCR (pb)
RELA tipo 1	GCGCTACTACCACGACCACT	GCTGCTCAATGATCTCCACA	350-400
RELA tipo 2	CCTGCACCTGGACGACAT	GCTGCTCAATGATCTCCACA	200-250
YAP1-MAM	CCAACCAGCAGCAACAGATG	GTGAGCCCATGATGTTGCC	350-400
YAP1-FAM	GAGTGCTCCAGTGAAACAGC	CCTGTTCCAATCACTAGCA	350-400

Tabela 3 - Programação do termociclador para a realização das reações de PCR.

	Fusões <i>RELA</i>	Fusões <i>YAP1</i>
Desnaturação inicial	95°C (5 min)	95°C (5 min)
Desnaturação 40 ciclos	95°C (40 seg)	95°C (40 seg)
Temperatura de anelamento	60°C (40 seg)	58-60°C (40 seg)
Extensão Intermediária	72°C (1 min)	72°C (1 min)
Extensão Final	72°C (7 min)	72°C (7 min)

4.5. Sequenciamento de Sanger

Os fragmentos amplificados por RT-PCR foram sequenciados através do aparelho *ABI PRISM 3100XL DNA Sequencer* (Perkin-Elmer, Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), utilizando o reagente *Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*. Os *primers* do sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação de RT-PCR. Para cada reação (Volume final = 10 µL) foram utilizados: 1 µL do produto de PCR; 1 µL de *Big Dye Terminator* e 2 µL de tampão (Tris-HCl 0,2M pH 9,0 e MgCl₂ 50mM). O programa para reação de sequenciamento está descrito na Tabela 4.

Resumidamente, após o término da reação, foi realizada precipitação, utilizando: 1 µL de EDTA 125nM; 1 µL de acetato de sódio 3M (pH4,0) e 25 µL de etanol absoluto. O material foi incubado à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugado por 30 minutos a 3000 rpm, -4°C. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 35 µL de etanol 70% gelado seguido por centrifugação por 15 minutos à 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram ressuspensas em tampão de injeção (formamida) e sequenciadas por método automatizado. As análises foram realizadas com o *software CodonCode Aligner 8.0.2*.

Tabela 4 - Programação do termociclador para realização das reações de sequenciamento

Temperatura/ Tempo	
Desnaturação inicial	96°C (1 min)
Desnaturação 30 ciclos	96°C (15 seg)
Temp. anelamento	50°C (15 seg)
Extensão final	60°C (4 min)

4.6. PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

A avaliação das expressões gênicas das amostras dos pacientes de fossa posterior foi realizada por PCR quantitativa em tempo real para os genes *LAMA2* (número de catálogo: Hs00166308_m1), *TNC* (número de catálogo: Hs01115665_m1) e *NELL2* (número de catálogo: Hs00196254_m1). O monitoramento contínuo da fluorescência foi realizado por sondas Taqman®, utilizando o equipamento *QuantStudio™ 12K Flex* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, EUA). Todas as amostras de pacientes foram analisadas em

duplicata e as diferenças na quantidade de *cDNA* total adicionada em cada reação foram normalizadas com dois genes de referência: *HPRT*- *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* (número de catálogo: 4326321E) e *GUSB*- *glucuronidase beta* (número de catálogo: 4326320E). O valor da média da expressão gênica de um *pool* de cérebro humano normal de um menino de 18 anos- número de catálogo 636530 (Clontech Laboratories, Inc., CA, EUA) foi utilizada como amostra de referência, sendo definida como valor 1.

A quantificação relativa da expressão foi determinada empregando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), onde o $\Delta CT = C_T$ de genes alvo – média geométrica dos dois genes de referência.

4.7. Análise de expressão gênica *in silico*

A expressão gênica de 110 amostras de ependimomas de fossa posterior do gene *LAMA2*, *NELL2* e 106 amostras do gene *TNC* foi obtida a partir de dados disponíveis de *Affymetrix HG U133 Plus 2.0 microarrays* no *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* do estudo Pajtler et al. (2015). Os dados foram identificados e plotados no GraphPad Prism versão 5.0.

4.8. Expressão proteica de LAMA2, TNC e NELL2

Quarenta e uma amostras de EPNs de fossa posterior (30 tumores primários com duas recidivas pareadas e 9 amostras apenas de recidivas) foram classificadas em cortes histológicos de 4µm de espessura por método colorimétrico (imuno-histoquímica) para *LAMA2*, *TNC* e *NELL2*, assim como duas amostras de EPNs supratentoriais para p65/NF-KB. Após completa desparafinização e posterior hidratação, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato de sódio (pH 6,0) em panela à vapor e, em seguida, resfriados em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão fosfato salina (PBS), os cortes foram tratados por 10-20 minutos (a depender do anticorpo primário) com solução 3% de H_2O_2 para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Os cortes histológicos foram novamente lavados três vezes com PBS e incubados por um tempo que variou de 10-20 minutos com 0,5% de *bovine serum albumin* (BSA) e 0,5% de

caseína em PBS para reduzir as ligações inespecíficas do anticorpo. Em seguida, os cortes foram incubados em anticorpos primários específicos: anti-LAMA2 (Abnova, Taipei City, Taiwan; H00003908- M01; diluição 1:250, *overnight*), anti-TNC (Novus Biologicals, Cambridge, UK; NB 110-68136; diluição 1:100, 2 horas), anti-NELL2 (Abcam, Cambridge, MA; ab80885; diluição 1:100, 2 horas), anti-p65 NF-KB (Cell Signaling, clone D14E12 XP, diluição 1:800, 1 hora) devidamente diluídos com *bovine serum albumin* (BSA) 1%.

Decorrido o período de incubação com os anticorpo primários, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com anticorpo secundário, e em seguida incubados com o polímero *REVEAL Polyvalent HPR-DAB Detection System* (*Spring Bioscience, Canada Customers, US*) e o complexo antígeno-anticorpo formado foi detectado com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). Por último, as lâminas foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, lavadas com água corrente, desidratadas com três lavagens em álcool absoluto, imersas duas vezes em xilol e montadas com *PermOUNT* (MERCK, Darmstadt, DE). Todas as etapas após a recuperação antigênica foram realizadas em temperatura ambiente.

Uma amostra de carcinoma pulmonar de células escamosas, uma de pâncreas normal adulto, uma de córtex cerebral e uma de colecistite crônica humana foram selecionadas como controles positivos para TNC, LAMA2, NELL2 e p65/NF-KB, respectivamente. Como controle negativo da reação foi realizado a substituição do anticorpo primário por tampão PBS 1X.

Os padrões de imuno-marcação das amostras de fossa posterior foram analisados por um patologista, Dr. Fabiano Saggioro (FMRP-USP) segundo critérios descritos por Witt et al. (2011), Araki et al. (2016) e Andreiuolo et al. (2017), onde foi considerado a intensidade de marcação, utilizando um sistema de pontuação: 0= negativo, 1= fraco, 2= moderado, 3= forte; e para a porcentagem de células marcadas: 0 e 1 <10%; 2= 10<50% e 3 > 50%. Campos representativos de alguns casos foram fotografados de forma digital pelo programa *NIS Elements* em microscópio de luz (*Nikon*). Os dois casos de EPN supratentorial foram analisados pela Prof^a Dra. Leandra N. Z. Ramalho, onde foi considerado positivo quando >50% dos núcleos das células mostraram intensa positividade (Gessi et al., 2017).

4.9. Análise Estatística

A associação entre as variáveis clínicas e histológicas foi testada pelo Teste de *Fisher* (duas variáveis dicotômicas). Os teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (para duas variáveis) foi empregado para averiguar se havia correlação dos níveis de expressão gênica *LAMA2*, *TNC* e *NELL2*, e a porcentagem de células positivas tumorais na IHQ, <10%, 10<50% e >50%. A correlação entre a expressão dos genes foi analisada pelo teste *Spearman*. As diferenças nos valores da expressão gênica foram apresentadas através da razão de mudança ou *Fold Change* (FC), calculada a partir da divisão dos valores medianos da expressão dos genes para cada variável. A análise de sobrevida livre de eventos (óbito/recidiva *versus* remissão completa) e sobrevida global (óbito *versus* não óbito) foi baseada em curvas de *Kaplain-Meier* e as variáveis clínicas e a diferença entre elas analisada pelo teste de *log-rank*.

Diferenças entre os grupos foram considerados estatisticamente significante quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizadas no programa estatístico SPSS versão 20.0 como no GraphPad Prism versão 5.0. (SPSS Inc. Chicago, USA, GraphPad Prism, San Diego, CA, Estados Unidos).

A análise dos dados obtidos do sequenciamento foi realizada utilizando o *software CodonCode Aligner 8.0.2*.

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Classificação molecular de EPNs supratentoriais

Seis amostras de *RNA* positivas para fusões gênicas *RELA* tipo 1 e 2 foram cedidas pelo pesquisador Dr. Kristian W. Pajtler do instituto do câncer DKFZ (*German Cancer Research Center*). A partir do padrão de bandas observado na PCR e pelos dados do sequenciamento (Sanger) foi possível inferir que as amostras controle 1EP8, 15EP3, 16EP11, 9EP13 e 16EP8 possuem as fusões *RELA* tipos 1 e 2 (fragmento entre 350-400 pb e 200-250 pb, respectivamente), enquanto a amostra 9EP43 apresentou somente fusão *RELA* tipo 1 (Figura 3A, B e C).

Figura 3 - Transcritos de fusões *RELA* tipos 1 e 2 em amostras controle. **A)** Produtos da RT-PCR indicando os transcritos detectados em 6 amostras controle positivas; **B)** Eletroferogramas dos transcritos fusionados representando 2 controles de *RELA* tipo 1 (1EP8 e 9EP43) e **C)** *RELA* tipo 2 (16EP8 e 15EP3). Acima há indicação das regiões exônicas envolvidas e a esquerda está a identificação da amostra. Marcador DNA 1kb.

As análises para a fusão *C11orf95-RELA* foram realizadas em 26 casos de EPN-ST, incluindo 14 amostras de tumores primários, três casos de tumores primários com suas respectivas recidivas e nove amostras provenientes apenas de

recidivas. Dentre as 14 amostras de tumores primários, três (18%) apresentaram fusão *RELA*, sendo dois casos *RELA* tipo 1 e um caso fusão *RELA* tipo 1 e *RELA* tipo 2. As três amostras de tumores primários pareadas com as respectivas recidivas não apresentaram fusões gênicas. Dentre as nove amostras de recidivas sem tumores primários disponíveis, 5/9 (56%), apresentaram fusão *RELA*, dois dos cinco foram casos *RELA* tipo 1 e os outros três casos caracterizados por fusão *RELA* tipo 1 e tipo 2 (Figura 4A, B, C e D).

Um caso de EPN primário (EPN 5) apresentou no gel de eletroforese uma banda maior que 400pb, diferente do esperado para a fusão *RELA* tipo 2 (200-250 pb) (Figura 4B). A análise do sequenciamento mostrou que a região amplificada apresenta uma ponto de quebra entre a sequência parcial do éxon 4 do gene *C11orf95*, 26 pares de bases pertencentes ao ncRNA (RNA não codificante), *LOC105369347*, e uma sequência parcial do éxon 1 do gene *RELA*, sendo uma fusão ainda não descrita na literatura (Figura 5A). De modo interessante, a amostra EPN 5, mostrou marcação nuclear positiva para p65/*RELA*, presente em mais 50% das células tumorais (Figura 5C).

Devido à indisponibilidade de controles positivos para as fusões *YAP1* (*YAP1-MAMLD1* e *YAP1-FAM118B*), buscou-se observar no gel de eletroforese a presença de *amplicons* com tamanho semelhante ao descrito por Pajtler et al. (2015), 250 pb, e confirmá-los por sequenciamento de Sanger.

Entre os 17 EPNs-ST primários, três tumores primários e um tumor primário e sua recidiva pareada (24%) (EPN 2; 11; 14; 16-D e 16-R) apresentaram duas bandas intimamente próximas (entre 350-400 pb) consistentes com transcritos da fusão *YAP1-MAMLD1* (Figura 6A). O resultado do sequenciamento da banda de menor tamanho (350 pb) confirmou a presença de fusão envolvendo o éxon 5 do gene *YAP1* e o éxon 3 do *MAMLD1* em todas as amostras (Figura 6B). A fusão entre éxon 6 do *YAP1* e éxon 2 do *MAMLD1*, também descrita por Pajtler et al. (2015), não foi identificada em nenhuma amostra avaliada. No entanto, o sequenciamento da banda de peso molecular maior, presente nas mesmas cinco amostras, revelou uma variante da fusão ainda não descrita na literatura, envolvendo o éxon 5 do gene *YAP1* e o éxon 2 do gene *MAMLD1* (Figura 6C). A baixa qualidade do sequenciamento das bandas encontradas, mas principalmente da banda 400 pb deve-se ao fato de estarem intimamente próximas, sendo necessário a separação das mesmas para uma melhor identificação pelo sequenciamento direto.

Figura 4 - Transcritos de fusões *RELA* tipo 1 e 2 nas amostras de EPN-ST pediátricas. **A)** Produtos da RT-PCR indicando oito transcritos da fusão *RELA* tipo 1 detectados em tumores primários e recidivas; **B)** Produtos da RT-PCR utilizando *primers* para fusão tipo 2; **C)** Eletroferogramas dos transcritos com fusão *RELA* tipo 1 de duas amostras (EPN 3 e 4); **D)** Eletroferogramas dos transcritos com fusão *RELA* tipo 2 de duas amostras (EPN 4 e EPN19-R). CT+: controle positivo. Acima há indicação das regiões exônicas envolvidas e a esquerda está a identificação da amostra. Marcador DNA 1kb.

Figura 5 – Transcrito da fusão *C11orf95-LOC-RELA* detectada em uma amostra de EPN-ST e imuno-marcação para p65/RELA. **A)** Eletroferograma representativo da fusão *C11orf95-LOC-RELA*; **B)** Imuno-marcação de p65/RELA do controle positivo: colecistite crônica; **C)** Imuno-marcação da amostra EPN 5, correspondendo aos resultados de IHQ de p65/RELA (setas apontando a marcação nuclear positiva). Imagens acima: amplificação de 20X/ Abaixo: amplificação de 40X.

Figura 6- Transcritos de fusões *YAP1-MAM* nas amostras de EPN-ST pediátricas. **A)** Produtos da RT-PCR indicando os transcritos da fusão *YAP1-MAM* identificadas em cinco amostras; **B)** Eletroferogramas dos transcritos, representando a fusão entre o éxon 5 do *YAP1* e o éxon 3 do *MAMLD1* (produto da PCR = 350 pb); **D)** Eletroferogramas representativos de uma variante da fusão *YAP1-MAM*, não descrita na literatura, formada pelo éxon 5 do *YAP1* e o éxon 2 do *MAMLD1* (produto da PCR = 400 pb). Acima há indicação das regiões exônicas envolvidas e a esquerda está a identificação da amostra. Marcador DNA 1kb.

Em contrapartida, não foram identificados casos positivos para fusão *YAP1-FAM*. De acordo com os resultados de RT-PCR sugeriram que as amostras EPN 4; 8 (fusão *RELA* positivas), 7; 9; 10 e 24-R poderiam apresentar esta fusão (Figura 7A). Para confirmar a especificidade dessas bandas, foi realizada uma *Nested-PCR* (N-PCR) com os produtos amplificados que no gel apareceram como bandas fracas (EPN 4; 7; 8, 9 e 10), com o objetivo de aumentar a especificidade do produto de PCR. No entanto, o sequenciamento confirmou a ausência de fusão *YAP1-FAM* em

todos os casos; tratando-se de sequências gênicas com 100% de similaridade com *bacterial artificial chromosomes* (BACs) clones presentes no cromossomo 4 sem associação com genes candidatos à fusão (Figura 7B).

Figura 7- Imagens ilustrativas do gel de agarose para a RT-PCR da fusão *YAP1-FAM*. **A)** Produtos da RT-PCR indicando *amplicons* de 400 pb em seis amostras (EPN 4; 7; 8; 9; 10 e 24-R) analisadas para os *primers* de *YAP1-FAM*; **B)** Eletroferogramas representativos de uma região inespecífica obtida pelo sequenciamento de Sanger. A esquerda está a identificação da amostra. Marcador DNA 1kb

5.2. Classificação molecular de EPNs de Fossa Posterior

Para a estratificação do EPN-FP pelo padrão de expressão proteica foi necessário estabelecer parâmetros ótimos da reação de IHQ para cada anticorpo específico e com as respectivas amostras controles positivos. Um tecido de pâncreas normal foi selecionado como controle positivo para LAMA2, o anticorpo primário foi utilizado diluição 1:250, com tempo de incubação *overnight*. Para TNC foi selecionada uma amostra de carcinoma pulmonar de células escamosas, o anticorpo utilizado na diluição 1:100 com incubação por duas horas. Enquanto que, para NELL2 foi utilizada uma amostra de córtex cerebral (marcação em corpo de

neurônio) com anticorpo na diluição 1/100 e incubação por duas horas (Anexo II). Para todos os marcadores estudados, os tumores com marcação intensa (>50%) e moderada (10<50%) foram considerados como imuno-marcação positiva, enquanto que os casos com marcação fraca ou negativa (<10%) foram agrupados como imuno-marcação negativa.

Foram avaliados 39 casos de EPN-FP, sendo 30 tumores primários (dois casos são tumores primários com as respectivas recidivas) e nove amostras de recidivas sem os respectivos tumores primários. Duas amostras de tumores primários foram excluídas dessas análises, pois não o material parafinado estava insuficiente para análise, foram analisadas apenas suas respectivas recidivas (EPN 57-R e 58-R).

O anticorpo LAMA2 apresentou uma elevada imuno-reatividade citoplasmática, sendo positivo em 87% (26/30) dos casos analisados de EPNs primários, incluindo o tumor primário e sua respectiva recidiva, assim como em sete das nove amostras que possuíam apenas recidivas. Já o anticorpo NELL2, em concordância com descrições da literatura, apresentou marcação contrária ao LAMA2, sendo observada marcação negativa em quase totalidade dos casos, com exceção de uma amostra de recidiva que apresentou uma imuno-marcação citoplasmática focal.

Dessa forma, do total de EPNs-FP primários avaliados, 87% (26/30) foram positivos para LAMA2 e negativos para NELL2, sugestivo de pertencerem ao EPN FP Grupo A, enquanto o restante, 13% (4/30) dos casos foram negativos para ambos, esse perfil de imuno-marcação é indicativo pertencerem ao Grupo não-A e não-B (Figura 8A e 9A). Em relação às amostras provenientes apenas de recidivas, 78% (7/9) apresentaram marcação sugestiva de EPN FP Grupo A (LAMA2+; NELL2), um caso (11%) foi positivo para ambos os marcadores citados e o outro, 11%, foi negativo para LAMA2 e NELL2 (Figura 8B, 8C e 9B).

A imuno-marcação de TNC foi avaliada em 28 amostras primárias e 89% (25/28) das amostras foram positivas para esse marcador. Enquanto que entre as nove amostras de recidiva avaliadas, sete (78%) também apresentaram marcação positiva.

A imuno-marcação para LAMA2, NELL2 e TNC foi estabelecida de acordo com a porcentagem de células marcadas, sendo <10% (negativo), 10<50% (marcação moderada) e >50% (marcação intensa). Já para o marcador NELL2, todos os casos foram negativos, impossibilitando análises comparativas. Para

pacientes com marcação moderada *versus* marcação intensa para LAMA2 apresentaram estimativas de SG = $62,5\% \pm 15,5\%$ *versus* $34,6\% \pm 18,3\%$ ($p=0,4$) e estimativas de SLE = $42,4\% \pm 15,6\%$ *versus* $18,5\% \pm 16,1\%$ ($p=0,42$). Já para a proteína TNC, pacientes com marcação moderada *versus* marcação intensa tiveram estimativas de SG = $34,6\% \pm 14,5\%$ *versus* $62,5\% \pm 21,3\%$ ($p=0,27$) e para SLE = $53,5\% \pm 24,8\%$ *versus* $31,3\% \pm 13,0\%$ ($p=0,12$). Foram identificados poucos casos negativos para LAMA2 e TNC, não sendo possível a realização das análises de sobrevida dos pacientes de acordo com esta classificação, apenas entre marcação moderada e intensa.

Figura 8 – Imagens de lâminas de imuno-histoquímica utilizadas para classificação molecular das amostras de EPN-FP. **A)** Imagens representativas da expressão proteica de LAMA2/ NELL2 e TNC de quatro casos de EPN FP, todos sugestivos de serem EPN-FP-Grupo A (LAMA2+/NELL2-); **B)** Imagem representativa de um caso pertencente ao Não Grupo A e B (LAMA2+ e NELL2-); **C)** Imagem representativa de um caso pertencente ao Não Grupo A e B (LAMA2- e NELL2-). Magnificação original de 40X.

Figura 9 – Distribuição das amostras de EPN-FP em relação a marcação com os anticorpos LAMA2 e NELL2. **A)** Tumores primários com imuno-marcação LAMA2+/NELL2- e LAMA2-/NELL2-; **B)** Imuno-marcação de amostras recidivadas LAMA2+/NELL2-; LAMA2-/NELL2- e LAMA2+/NELL2+ utilizadas para classificação molecular das amostras de EPN-FP.

Uma vez que não foram encontradas amostras representativas de EPN FP Grupo B nas amostras pediátricas, subgrupo este de maior prevalência em pacientes jovens e adultos, sete amostras de EPN de adultos foram analisadas por IHQ (incluindo uma amostra primária com sua recidiva pareada) utilizando os marcadores LAMA2 e NELL2. Dentre elas, quatro (57%) apresentaram o perfil LAMA2+/NELL2-, sugestivo de pertencer ao Grupo A, (Figura 10A), dois casos foram negativos para ambos (LAMA2-/NELL2-) e um caso teve marcação positiva para ambos marcadores (LAMA2+/NELL2+), referentes ao subgrupo não Grupo A e B. (Figura 10B).

Figura 10- Imagens de lâminas de imuno-histoquímica de EPNs adultos. **A)** Imagens representativas da expressão proteica de ambos marcadores: LAMA2+/NELL2+ em amostras de EPN FP, sugestivo de pertencer ao Grupo não A e B. **B)** Imagens representativas da expressão proteica de LAMA2+/NELL2- em amostras de EPN FP sugestivas de serem Grupo A. Magnificação original de 400X.

5.2.1. Expressão gênica de EPNs de Fossa Posterior

A expressão gênica dos marcadores *LAMA2*, *NELL2* e *TNC* foram avaliados pela técnica de RT-qPCR. No entanto, os resultados obtidos não seguiram o mesmo perfil de expressão proteica encontrado por IHQ. O grupo de tumores com imunomarcacão negativa (<10%) para *LAMA2* apresentaram mediana de expressão gênica relativa de 30,15 (média = 47,20; variação de 21,14 a 90,30). Já no grupo de imuno-

marcação moderada (10<50%) apresentaram mediana de 8,51 (média = 20,30; variação de 0,08 a 57,02), enquanto que os casos com imuno-marcação intensa (>50%) apresentaram mediana de 2,97 (média= 13,67; variação de 0,33 a 39,98), sem diferenças estatísticas entre os grupos ($p>0,05$). Para os tumores com imuno-marcação negativa (<10%) para TNC a mediana de expressão gênica foi igual a 25,78 (média = 25,22; variação de 16,55 a 33,32), tumores com imuno-marcação moderada (10<50%) apresentaram mediana de 10,97 (média = 55,60; variação de 0,93 a 105,15), para imuno-marcação considerada intensa (>50%) apresentou uma mediana de 113,16 (média= 162,55; variação de 0,51 a 544,18, sendo observada diferença significativa entre os grupos com imuno-marcação moderada e intensa $p<0,05$ (Figura 11A). Para a IHQ de NELL2, não foi possível realizar análise estatística, uma vez que, foram encontradas apenas amostras com imuno-marcação negativas (<10%). No entanto, a mediana da expressão gênica desses tumores foi igual a 0,27 (média= 0,54; variação de 0,03 a 2,75).

Nas análises de correlação de *Pearson* entre as expressões gênicas dos marcadores subgrupos específicos observou uma correlação negativa significativa entre os genes *NELL2* e *LAMA2* ($\rho = -0,47$; $p<0,05$) (Figura 11B). *NELL2* não apresentou correlação significativa com o gene *TNC* ($\rho = -0,34$; $p=0,081$) (Figura 11C). Porém, foi observada correlação positiva significativa entre as expressões dos genes *TNC* e *LAMA2*, $\rho = 0,65$; $p<0,01$ (Figura 11D).

Figura 11- Correlação de expressão gênica e expressão proteica e correlação de *Pearson*. **A)** Correlação de expressão proteica de 10<50% e >50% de células tumorais positivas de TNC com expressão gênica do TNC ($p < 0,05$) Teste de *Mann-Whitney*; **B)** Correlação negativa entre a expressão gênica do LAMA2 e NELL2 ($p < 0,05$); **C)** Correlação negativa entre a expressão gênica de TNC e NELL2 com expressão gênica do LAMA2 e NELL2 ($p < 0,081$); **D)** Correlação positiva significativa ($p < 0,01$) entre a expressão gênica de TNC e LAMA2. Teste de correlação de *Pearson*.

Ao analisar a expressão gênica de *LAMA2*, *NELL2* e *TNC* em amostras de adultos ($n=5$), foi observado níveis de expressão gênica semelhantes ao perfil encontrado nos tumores pediátricos, para todos os genes analisados, *LAMA2* ($p=0,073$); *NELL2* ($p=0,065$) e *TNC* ($p=0,17$). Apesar de não terem sido identificadas, diferenças significativas, as razões de mudança (*Fold change*) entre a mediana de expressão das amostras pediátricas e adultas variaram de 4,54; 7,15 e 0,33 para os genes *LAMA2*, *TNC* e *NELL2*, respectivamente (Figura 12A, 12C e 12E). O número amostral de adultos analisados é pequeno, de forma que há a necessidade de validar esses achados em um maior número de pacientes com EPN FP adultos

Nesse sentido, para averiguar se a expressão desses genes varia entre EPNs de fossa posterior pediátricos e adultos foram realizadas análises *in silico* utilizando dados de expressão gênica de *array* de Pajtler et al. (2015). Os resultados demonstraram diferença significativa ($p < 0.001$) das expressões de *LAMA2*, *TNC* e *NELL2* entre tumores pediátricos e adultos (Figura 12B; 12D e 12F).

Como contraprova, as fusões gênicas características de EPN-ST foram investigadas nas amostras de EPN fossa posterior. Como esperado não foi identificada nenhuma fusão RELA tipo 1 e 2 (Figura 13A e 13B), YAP1-MAM (Figura 13C), e YAP1-FAM (Figura 13D). Ao utilizar os *primers* para fusão RELA tipo 1, muitas amostras apresentaram um produto inespecífico, no entanto, nenhuma amostra foi possível de ser sequenciada (EPN 48; EPN 49; EPN 60-R e EPN-52).

Figura 12- Expressão de *LAMA2*, *TNC* e *NELL2* em amostras de EPN FP de tumores pediátricos *versus* tumores de adultos. **A)** Comparação da expressão gênica de *LAMA2* entre tumores pediátricos e adultos (p= 0,07); **B)** Comparação da expressão gênica de *LAMA2* entre tumores pediátricos e adultos em amostras de Pajtler et al., 2015 (p<0,0001); **C)** Comparação da expressão gênica de *TNC* entre tumores pediátricos e adultos (p= 0,17); **D)** Comparação da expressão gênica de *TNC* entre tumores pediátricos e adultos em amostras de Pajtler et al., 2015 (p<0,0001); **E)** Comparação da

expressão gênica de *NELL2* entre tumores pediátricos e adultos ($p= 0,06$); **F**) Comparação da expressão gênica de *NELL2* entre tumores pediátricos e adultos em amostras de Pajtler et al., 2015 ($p<0,0001$). Teste de Mann-Whitney.

Figura 13- Imagens ilustrativas de géis de agarose de RT-PCR das fusões RELA tipo 1 e 2, YAP1-MAM e YAP1-FAM em amostras de EPN FP. **A)** Análise de RT-PCR da fusão RELA tipo 1; **B)** Análise de RT-PCR da fusão RELA tipo 2; **C)** Análise de RT-PCR da fusão YAP1-MAM; **D)** Análise de RT-PCR da fusão YAP1-FAM. Acima há indicação do ID das amostras analisadas e a esquerda está a identificação do marcador DNA 1kb. CT+: controle positivo.

4.1. Análise dos dados clínicos e associação com subgrupos moleculares

Todos os dados da classificação molecular das amostras de EPN, assim como os dados clínicos dos pacientes, grau histológico dos tumores, grau de ressecção, protocolo de tratamento e desfecho clínico são apresentados na Figura 16. Pacientes com dados clínicos faltantes foram excluídos de algumas análises estatísticas.

A distribuição da casuística de tumores primários apresentou predominância de pacientes pediátricos com EPNs de fossa posterior (62,8%) quando comparado ao EPNs supratentoriais (36,2%). O número de casos com tumores de histologia anaplásica (grau III) foi semelhante a pacientes com diagnóstico grau II, e pacientes menores do que três anos corresponderam a 40,4% e 59,6% maiores do que três anos (Tabela 1).

Em nossa coorte, os pacientes que foram submetidos à ressecção cirúrgica completa quando comparados com aqueles que apresentaram ressecção cirúrgica incompleta apresentaram diferença significativa nas taxas de sobrevida global (cinco anos) de $83,6\% \pm 7,6\%$ *versus* $14,5\% \pm 12,9\%$, $p < 0,001$ e sobrevida livre de eventos (três anos) de $60,1\% \pm 9,9\%$ *versus* $12,5\% \pm 10,8\%$, $p < 0,000,1$ (Figura 14A e B). Adicionalmente, a análise de regressão de Cox apontou que o grau de ressecção apresenta risco relativo de 7,68 (2,36-24,91), $p < 0,001$, sugerindo ser uma variável com valor prognóstico em nossa casuística. As demais variáveis como idade ao diagnóstico, localização anatômica, gênero, grau histológico, protocolo de tratamento, recidiva e metástase ausente ou presente, não demonstraram correlação estatística no que se refere às taxas de sobrevida ($p > 0,05$).

Figura 14- Curva de *Kaplan-Meier* mostrando o tempo sobrevida de acordo com grau de ressecção cirúrgica. **A)** Sobrevida global em cinco anos de pacientes de EPN FP e ST submetidos a ressecção completa ou incompleta **B)** Sobrevida livre de eventos em 3 anos de pacientes de EPN FP e ST submetidos a ressecção completa ou incompleta. Teste de *log-rank*.

Pacientes do subgrupo EPN ST *RELA* tiveram uma média de idade de sete anos (variação de 2,6-13,7), enquanto que no grupo de pacientes EPN ST *YAP1*, foram encontrados em crianças mais novas, com média de idade igual a 0,9 anos (variação de 0,75-2). Pacientes não classificados nesses dois subgrupos apresentaram uma média de idade semelhante ao subgrupo *RELA*, igual a 6,3 anos (variação de 1,1- 11,6). Dentro do EPN Grupo A, por sua vez, predominou em crianças mais jovens com média de idade de 4,6 anos (variação de 0,60-12,8).

Em relação aos tumores primários do subgrupo *RELA*, dos três casos positivos, apenas dois casos tiveram dados clínicos disponíveis de acompanhamento do desfecho clínico, limitando a análise de sobrevida desse subgrupo. Dentre esses três EPNs ST *RELA* positivos, um era do sexo feminino e os outros dois do sexo masculino, dois com diagnóstico de grau histológico anaplásico e um diagnosticado como grau II. O grau de ressecção cirúrgica foi completo em todos os três pacientes e dois EPNs *RELA* recidivaram. Além disso, dois pacientes estão vivos, com relação ao terceiro, essa informação não está disponível.

Comparações entre o subgrupo EPN ST *YAP1* e o subgrupo ausente de fusão *RELA* e *YAP1*, evidenciaram diferença significativa com relação à idade ao diagnóstico, $p=0,007$, uma vez que todos os pacientes desse subgrupo ($n=4$) são menores do que três anos. As outras variáveis clínicas nesse grupo de amostras não apresentaram diferenças estatísticas (Anexo III). As taxas de sobrevida desse grupo também foi um limitante, uma vez que, apenas três casos exibiam dados clínicos de acompanhamento disponíveis.

Comparações entre as variáveis clínicas analisadas de EPNs classificadas como Grupo A com os quatro casos não Grupo A e B, não apresentaram diferença estatística (Anexo IV), enfatizando que não é possível uma conclusão segura com esse número de casos reduzido. Dentre os pacientes considerados como Grupo A, a idade ao diagnóstico (<3 anos *versus* >3 anos) mostrou diferenças entre as

sobrevidas em cinco anos (SG: 53,3% $\pm$ 17,3% *versus* 72,9% $\pm$ 13,5%), no entanto não resultou em diferença estatística, $p=0,067$ (Figura 15A) e a SLE em 2 anos de 25,0% $\pm$ 19,8 *versus* 57,1% $\pm$ 14,6%, $p=0,232$. Por outro lado, a comparação entre amostras do Grupo A que apresentaram grau de ressecção completo *versus* incompleto evidenciou diferença significativa na sobrevida global (cinco anos) de 83,1% $\pm$ 11,0% *versus* 21,4% $\pm$ 17,8%, $p<0,01$ e na SLE (2 anos) 63,5% $\pm$ 14,8% *versus* 25,0% $\pm$ 15,3%, $p<0,001$ (Figura 15B e C).

Figura 15- Curva de *Kaplan-Meier* mostrando o tempo sobrevida de pacientes EPN FP Grupo A. **A)** Sobrevida global em 5 anos de entre pacientes de Grupo A menores e maiores do que 3 anos, $p=0,067$; **B)** Sobrevida global em cinco anos de pacientes de Grupo A submetidos à ressecção completa ou incompleta, $p<0,01$; **C)** Sobrevida livre de eventos em dois anos de pacientes de Grupo A submetidos à ressecção completa ou incompleta, $p<0,001$. Teste de *log-rank*.

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O ependimoma (EPN) representa o terceiro tipo mais comum de neoplasia do SNC na infância e apesar do significativo progresso nas abordagens de tratamento, apenas 20% a 30% dos casos de EPN são controlados e cerca de 50% dos pacientes apresentam recidivas, destes 90% vão ao óbito (SOWAR et al., 2003; KORSHUNOV et al., 2010; ZACHAROULIS et al., 2010). Essa alta taxa de falhas terapêuticas está associada, principalmente, ao comportamento biológico heterogêneo do tumor, que dificulta o estabelecimento de diagnósticos precisos e a obtenção de resultados mais favoráveis (YAO et al., 2011). Avanços em análises genômicas e epigenômicas vêm fornecendo um panorama da diversidade molecular de inúmeros tumores e revelando vias de sinalização e genes chaves que impulsionam o desenvolvimento tumoral e que podem ser potenciais alvos terapêuticos (LIU et al., 2017).

Nesse contexto, a atual utilização da classificação histológica para estratificação de risco se mostra controversa e sem associações consistentes entre o grau tumoral e o prognóstico clínico do paciente (PAJTILER et al., 2015). Diante disso, trabalhos que abordam a classificação molecular de EPNs pediátricos ainda são recentes, mas vêm trazendo novas oportunidades para criação de uma precisa e confiável estratificação dos pacientes com ependimoma, bem como um potencial para alterar as decisões terapêuticas com base nas características moleculares (PAJTILER et al., 2017; LIU et al., 2017). Tendo em vista que o presente trabalho propõe a classificação molecular inédita de EPNs pediátricos em uma casuística brasileira, assim como a associação desta classificação com dados clínicos dos pacientes, os resultados obtidos são pertinentes e caracterizam molecularmente uma coorte brasileira.

Contudo, sabe-se que a tentativa de melhorar o prognóstico clínico dos pacientes com ependimoma permanecem insatisfatórios de várias formas. Fundamentalmente, por ser uma doença rara, o que dificulta o estudo da sua biologia e interpretação de estudos clínicos baseados em pequenas coortes de pacientes (GODFRAIND et al., 2013). Na nossa casuística não foi diferente, temos um número amostral limitado, principalmente quando os pacientes foram subdivididos de acordo com a classificação molecular compartimento específico como proposto por Patjler e colaboradores (2015).

A casuística em estudo, apresentou uma predominância de pacientes com EPNs localizados na região de fossa posterior, mantendo a correlação entre pacientes pediátricos descrita na literatura (KORSHUNOV, GOLANOV et al., 2004; TIHAN et al., 2008; GILBERT, et al., 2010). A taxa de ressecção cirúrgica completa ocorreu em cerca de 66% dos casos, sendo a única variável analisada que apresentou correlação significativa com as taxas de sobrevidas dos pacientes e com risco relativo significativo. Estudos têm proposto que a extensão da ressecção cirúrgica é um fator prognóstico independente e a ressecção cirúrgica completa mostra uma maior sobrevida global em 5 anos quando comparada a uma ressecção incompleta (RENI et al., 2007; ARMSTRONG et al., 2012; WRIGHT & GAJJAR, 2012; ANDREIUOLO et al. 2013).

Considerando os tumores do compartimento supratentorial (EPN ST), foi observada disparidade entre as frequências encontradas para as fusões *RELA* e *YAP1*. Em nossa casuística de EPN-ST primários foram observadas fusões *RELA* em 18% (3/17) das amostras primárias, sendo a fusão *RELA* tipo 1 identificada em 2/3 dos casos e 1/3 identificou-se ambas fusões, *RELA* tipo 1 e 2. Nas nossas amostras recidivadas, 56% (5/9) apresentaram fusão *RELA* tipo 1 e dessas, 3/5 possuem ambas as fusões tipo 1 e 2. Parker et al. (2014), por sua vez, identificaram fusão *RELA* em 75% (15/20) dos EPNs-ST pediátricos (n=20), e dentre as amostras *RELA* positivas, 67% (10/15) pertencem a fusão *RELA* tipo 1 e 40% (6/15) ao tipo 2, ou seja, uma frequência maior do que a observada em nossas amostras. Pietsch et al. (2014) identificaram fusões *RELA*, através de sequenciamento de RNA (RNAseq), em 74% das amostras de EPN-STs pediátricas avaliadas, porém sem especificação do tipo da fusão, uma vez que o estudo foi publicado em concomitância ao estudo que descreveu os sete subtipos da fusão *RELA*.

Recentemente, Malgulwar e colaboradores. (2017) identificaram fusão *RELA* em 57,1% (27/47). Entre os casos positivos, 89% (24/27) exibiram fusão *RELA* tipo 1; 7,3% (2/27) fusão *RELA* tipo 2; e 3,7% (1/27) apresentaram ambos os transcritos fusionados. Em 2017, Gessi e colaboradores, identificaram fusão *RELA* em 40% dos pacientes de EPN estudados (17/42). De acordo com o trabalho de Parker et al., 2014, os tipos 1 e 2 da fusão *RELA* foram as fusões mais frequentes, e por isso o presente estudo utilizou *primers* específicos apenas para esses tipos. No entanto, não se descarta a possibilidade de haver outros subtipos de fusões *RELA* nas mesmas amostras avaliadas.

Nesse contexto, fusões abrangendo outros genes têm sido relatadas na literatura, Pietsch et al. (2014) detectaram em EPN supratentorial um caso de fusão *RELA* negativa, com presença de fusão entre o gene *C11orf95* e o gene *NCOA1* (co-ativador de receptor de esteroide). Parker et al. (2015) também identificaram por RNAseq, sete outros transcritos de fusões envolvendo genes do cromossomo 11 em amostras *RELA* negativas. Duas destas fusões envolvem o gene *C11orf95* (*C11orf95-YAP1* e *C11orf95-MAML2*), sugerindo que a presença de domínios *zinc fingers* (ZNF), tipo C2H2 (Cys2-His2), do gene *C11orf95* seja um elemento essencial para característica oncogênica das fusões que o envolve, provavelmente alterando o tráfego, degradação e a especificidade à fatores de transcrição. Os domínios ZNF do tipo C2H2 são os mais comuns e interagem com diferentes tipos de moléculas, tais como DNA, RNA, proteínas, lipídios ou moléculas hidrofóbicas pequenas como hormônios esteroides (WOLFE, NEKLUDOVA, PABO, 2000; JEN & WANG, 2016). Recentemente, estudos revelaram que a expressão aberrante de proteínas ZNF contribui para tumorigênese em inúmeros tumores regulando genes sob diferentes contextos, incluindo ativação transcricional de *integrina $\beta 4$* e de *VEGF* (YANG et al., 2008). Além de promover a proliferação, migração, invasão celular por ativação transcricional da ciclina D1 (JEN et al., 2017, YANG et al., 2011) e indução de apoptose por regulação positiva de survivina, (*B-cell lymphoma 2*) *Bcl-2* e negativamente de caspase-3 e *B-cl2 associated X protein* (*Bax*) (FAN et al., 2015). Além disso, têm sido relacionado a transição epitélio-mesequimal por reduzir níveis de E-caderina e propiciar a transição epitélio-mesenquimal (LI et al., 2015; LV et al., 2017). De modo interessante, a fusão gênica, *ZMYND8-RELA*, encontrada em leucemia eritróide aguda, envolve o gene *RELA* e o gene *ZMYND8*, o último também apresenta domínios ZNF, porém do tipo *plant homeodomain* (PHD) (PANAGOPOULOS et al., 2013).

Em concordância com os trabalhos já citados, recentemente, identificaram fusões envolvendo o gene *anaplastic lymphoma kinase* (*ALK*) em duas amostras pediátricas de EPN-ST (*RELA* negativas). Uma translocação desbalanceada foi relacionada com a fusão *KTN1-ALK*, enquanto a fusão *CCDC88A-ALK* foi resultante de uma deleção intersticial (OLSEN et al., 2017). Essas e outras fusões não foram contempladas no presente estudo e podem estar presentes em nossa casuística.

Um exemplo disso, foi uma variante identificada em nossa casuística, envolvendo genes da fusão *RELA* (*C11orf95-LOC-RELA*), envolvendo uma região

parcial do éxon 4 do gene *C11orf95*, seguida por uma sequência de 26pb do gene *LOC105369347* (classe de RNAs não codificantes, próximo a 5' *RELA*) e do éxon 1 parcial do gene *RELA*. Essa fusão não foi relatada anteriormente na literatura e foi encontrada em uma criança com ependimoma grau II supratentorial agressivo, com óbito após 34 meses do diagnóstico, e que apresentou positividade para p65/RELA, sugerindo que a ativação da via NF- κ B é um elemento-chave compartilhado por ST-EPNs *RELA* e também conservado por essa nova fusão.

Esses achados reforçam o papel do p65-RELA na classificação de diferentes rearranjos de *RELA* em amostras EPNs-ST, que não dos tipos de fusão *RELA* 1 e 2. De modo semelhante, Gessi e colaboradores (2017) identificaram uma fusão variante utilizando *primers* para fusão *RELA* tipo 1 e 2, fusão esta envolvendo éxon 4 de *C11orf95* e 15 pb da região do íntron 2 do gene *RELA*, sendo um caso positivo para p65/RELA e para L1CAM.

A via NF-KB canônica é formada por duas subunidades *RELA*, também chamada de p65 e p50. Esse heterodímero é mantido no citoplasma por inibidores como o *inhibitor of κ B* (I κ B) que é degradado após sua fosforilação, permitindo a translocação do complexo NF-KB para o núcleo (KARIN et al., 2008). Embora p65 e p50 estejam estruturalmente relacionados, essas subunidades podem se ligar individualmente ao DNA como homodímeros a apresentar mecanismos de ativações transcricionais distintos. O p65/RELA é capaz de ativar a transcrição por uma única ativação do domínio carboxi-terminal (FUJITA et al., 1992). Dois estudos independentes, Figarella-Branger et al. (2016) e Parker et al. (2014) mostraram que a fusão *C11orf-95-RELA* possui hiperexpressão de p65/RELA e que a proteína fusionada se transloca para o núcleo espontaneamente, ativando uma gama de genes, entre eles, genes alvos da via NF-KB, esses dados sugerem ativação da via neste subgrupo de EPN. Em adição Ozawa et al. (2018), mostrou que os genes *RELA* e *C11orf95* sozinhos não formam tumores em modelo *in vivo*, porém a fusão gênica *C11orf-95-RELA* tipo 1 é tumorigênica e com amplo número de genes transcricionalmente associados a via TNF α - NF-KB, além de uma forte positividade para p65/RELA. Adicionalmente, neste estudo foi identificado que o efeito oncogênico desta proteína fusionada requer a fosforilação da serina (Ser) 486 e que produz efeitos biológicos não restritos apenas a via NF-KB. A fosforilação da Ser-486 e Ser-726 presente nos domínios de homologia REL e de transativação,

respectivamente, são responsáveis por promover a atividade transcricional de *RELA* (HUANG et al., 2010; HOESEL & SCHMID, 2013).

Além disso, a nova fusão identificada possui uma região intermediária entre os genes *C11orf95* e *RELA*, pertencente a um ncRNA, o *LOC105369347* e em diversos tumores já foram identificados fusões gênicas envolvendo RNAs não codificantes (MITRA, MITRA & TRICHE, 2012; LI et al., 2013; HAEMMERLE & GUTSCHNER, 2015). Em um paciente de linfoma de células B, foi encontrada uma fusão entre o proto-oncogene *Bcl-6* e o gene não codificante, *GAS5* (NAKAMURA et al., 2008). Outro estudo em câncer de próstata identificou fusões recorrentes envolvendo o gene *ETV1* e o gene não codificante, *PCAT-14*, *TMPRSS2* e *SLC45A3* (TOMLINS et al., 2007; PRENSNER et al., 2011). Normalmente, esses ncRNAs contribuem para a regulação anormal do gene que está fusionado e impulsionam a expressão de uma proteína aberrante, podendo tornar esses genes codificantes e funcionalmente relevantes (SHAHROUKI & LARSSON, 2012; LATYSHEVA & BADU, 2016). Sabe-se que o fenômeno responsável pela fusão *RELA* é o *chromothripsis* e isso pode explicar a presença de 26 pb do gene *LOC105369347*, uma vez que, encontra-se lateralmente a região 5' de *RELA* (PARKER et al., 2014). Nesse caso, a porção do ncRNA pode estar sendo codificado e favorecendo a função oncogênica do transcrito fusionado. No entanto, a real função do gene *LOC105369347* nesta fusão ainda precisa ser melhor esclarecido.

A fusão *YAP1* foi encontrada com uma frequência relativamente alta nas amostras primárias, sendo 24% (4/17) dos casos positivos para a fusão *YAP1-MAMLD1*. Estudos anteriores utilizando padrões de metilação do DNA e RNAseq, apresentaram uma frequência menor de fusões *YAP1* em amostras de EPN, variando de 2,6% a 5% (PARKER et al., 2014; PAJTLER et al., 2015). De maneira interessante, as mesmas quatro amostras positivas apresentaram uma segunda isoforma da fusão *YAP1*, fusão ainda não descrita na literatura entre o éxon 5 do gene *YAP1* e o éxon 2 do gene *MAMLD1*. Até o momento, estudos haviam relatado este tipo de evento apenas para as fusões *RELA*, podendo ser encontrado diferentes subtipos da fusão em uma mesma amostra. Esse perfil poderia estar associado à formação de rearranjos cromossômicos em tumores positivos para uma determinada fusão gênica. Assim, o DNA genômico de tumores poderiam sofrer *splicing alternativo* distintos, gerando clones e subtipos fusionados diferentes em

uma mesma massa tumoral, uma vez que, o *splicing* é necessário para gerar um transcrito fusionado “maduro” (PARKER et al., 2014; PAJTLER et al., 2015).

Ainda sobre a fusão *YAP1-MAM*, o paciente que apresentou a fusão no tumor primário (também apresentou fusão na sua recidiva. A estabilidade da classificação molecular do tumor primário para a recorrência tumoral havia sido previamente investigada por Pajtler et al. (2015) por meio de metilação do DNA em 48 tumores primários e suas recidivas correspondentes. De forma notável, este estudo observou que todas as amostras recidivadas, sem exceção, se agrupavam diretamente ao lado das suas amostras primárias ou próximas delas, pertencendo ao mesmo subgrupo molecular que amostra diagnóstica (PAJTLER et al., 2015). Esse resultado sugere, fortemente, que os casos em que se tem apenas a amostra de recidiva como representativa do tumor, é muito provável que os seus tumores primários se agrupem no mesmo subtipo molecular que sua recidiva.

A classificação molecular dos EPNs de fossa posterior foi, inicialmente, descrita por Witt et al. (2011) e, posteriormente, relatada por outros grupos de pesquisa (WANI et al., 2012; HOFFMAN et al., 2014; ARAKI et al., 2016). A heterogeneidade molecular dentro dos tumores desse compartimento foi representada por dois subgrupos: o Grupo A e o Grupo B. A partir de marcadores estabelecidos por perfil transcricional (Grupo A: LAMA2; Grupo B: NELL2) foi sugerido, que anticorpos disponíveis comercialmente para esses biomarcadores poderiam ser utilizados para estratificação das amostras por imuno-histoquímica, como LAMA2, NELL2 e TNC (WITT et al., 2011).

No nosso estudo, observamos que quase a totalidade dos EPNs FP primários e recidivados apresentaram expressão proteica de moderada a forte para LAMA2, laminina alfa-2, 26/30 (87%) e 1/9 (89%), respectivamente. LAMA2 é uma proteína de matriz extracelular, componente da membrana basal (LATHIA et al., 2012), e com expressão predominante no citoplasma de células de EPN-FP do Grupo A (WITT et al., 2011; HOFFMAN et al., 2014). Sua expressão está relacionada com pior prognóstico, SLE de 47% e SG de 69% em cinco anos, por isso, pacientes deste grupo requer terapia mais intensa (WITT et al., 2011). Alguns estudos já descreveram o papel de LAMA2 no processo de tumorigênese em gliomas e sua associação com processos metastáticos iniciais em carcinoma renal de células claras (LATHIA, et al., 2012; NIIBORI-NAMBU et al., 2013; YANG et al. 2017). Em contrapartida, amostras tumorais de câncer de laringe apresentaram redução

significativa dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) de *LAMA2* em comparação a tecidos normais (NI et al., 2012) e, em carcinoma hepatocelular a redução da expressão gênica de *LAMA2* tem sido associada a aumento da proliferação celular e prognóstico desfavorável (JHUNJHUNWALA et al., 2014).

Já para *NELL2* a expressão proteína foi oposta à de *LAMA2*, positiva em apenas um caso de recidiva e negativa para todos os tumores primários. Essa expressão contrária de *LAMA2* e *NELL2* foi encontrada na correlação de expressão gênica, o qual esses genes mostraram uma correlação negativa. *NELL2* é uma proteína enriquecida em tecido neural (AIHARA et al., 2003) e presente no citoplasma de células de EPN-FP Grupo B, o qual é formado por tumores com prognóstico satisfatório, SLE de 79% e SG de 95% em 5 anos (WITT et al., 2011). Sua hiperexpressão já foi, previamente, observada em tumores neuronais e em células de linfoma de Burkitt (KURODA et al.; 1999 MAEDA et al., 2001). No entanto, o mecanismo molecular da hiperexpressão gênica e proteica de *NELL2* em células tumorais não está esclarecido (KIM et al., 2013).

Já era de se esperar que quase a totalidade da nossa casuística (85%) se enquadrasse como amostras sugestivas de serem Grupo A, *LAMA2* positivo e *NELL2* negativo, uma vez que, Witt et al. (2011) observaram que pacientes do Grupo A eram, significativamente, mais jovens (média de 4 anos de idade *versus* 39 anos para pacientes do Grupo B). Wani et al. (2012) também demonstraram que 97% dos pacientes de EPN Grupo A eram menores que 10 anos de idade, ratificando que o Grupo A predomina na população de pacientes infanto-juvenil. No presente estudo, a média de idade dos pacientes de EPN-FP foi de 4,6 anos, confirmando este achado. Interessantemente, Lourdusamy et al. (2015) observaram que a expressão elevada de *LAMA2* em EPN coincidia com a expressão diminuída do miR-29a, sugerindo a regulação de *LAMA2* pela família de miR-29a. Apesar da desregulação de micro-RNAs ser um possível mecanismo para a expressão alterada de *LAMA2* em EPN Grupo A, fazem-se necessários estudos mais detalhados que revelem as reais causas da elevada expressão gênica e/ou proteica de *LAMA2* em EPN. Por outro lado, até o momento, não há relatos dos mecanismos que aumentariam os níveis de expressão gênica e/ou proteica de *NELL2* em EPN.

O terceiro marcador avaliado nas amostras de EPN-FP foi a TNC, que é uma glicoproteína presente matriz extracelular e, portanto, com bastante imunoreatividade no compartimento extracelular, principalmente, em regiões

perivasculares. Além dos relatos sobre expressão positiva de TNC em ependimomas pediátricos (KORSHUNOV; GOLANOV; TIMIRGAZ, 2002; PUGET et al., 2009). A imuno-marcação positiva para TNC foi avaliada presente em 89% (25/28) das amostras primárias e em 78% (7/9) das amostras recidivadas.

Estudos mostraram que a TNC apresenta características de um marcador de pior prognóstico, sendo expresso em pacientes mais jovens e em ependimomas anaplásicos (ARAKI et al., 2016, ANDREIUOLO et al., 2017). Como a TNC é um marcador de pior prognóstico, era presumível que sua expressão fosse semelhante ao LAMA2 que é o imuno-marcação específico do Grupo A, subgrupo de pior prognóstico. Assim, em relação aos tumores primários nossa casuística apresentou 78% (22/28) e 66% das amostras recidivadas foram positivas tanto para LAMA2 como para TNC e do mesmo modo os casos sugestivos de tumores primários EPN FP Grupo A, 78% (22/28) tiveram marcação positiva para TNC. Em concordância com a literatura, nossos resultados mostraram correlação positiva entre a expressão gênica *LAMA2* e *TNC*.

No entanto, a sobrevida global em 5 anos para os pacientes com TNC e LAMA2 positivos (n=13) *versus* TNC e LAMA2 marcação oposita (n=6), foram de 54,9% $\pm$ 15,6% *versus* 33,3% $\pm$ 19,2%, enquanto que a sobrevida livre de eventos em 5 anos foi igual a 28,6% $\pm$ 22,3% *versus* e 50% $\pm$ 35,4%, apesar de a SLE ter se apresentado como uma sobrevida com diferenças expressivas, não houve diferença estatística em ambas as sobrevidas com $p > 0,05$, não sendo possível conclusões fidedignas diante da limitação no número de amostras analisadas no grupo de tumores que possuem marcação oposita entre LAMA2 e TNC (n=6). Além disso, evidenciou-se imuno-marcação heterogênea de TNC nas nossas amostras, ou seja, regiões de marcação intensa alternadas com regiões de baixa expressão, tal como descrito por Andreiuolo et al., (2017).

Em concordância, dois estudos recentes mostraram, por IHQ, que a expressão positiva da TNC é mais elevada em pacientes do Grupo A (94%) do que do Grupo B (11%) (WITT et al., 2011; WANI et al., 2012). Recentemente, em gliomas, foi demonstrado que TNC aumenta a atividade da via Notch em células iniciadoras de tumor cerebral e promove o crescimento tumoral (SAKAR et al., 2017), bem como estimula a invasão de células iniciadoras de tumor cerebral (SAKAR et al., 2015). Outros trabalhos também demonstraram sua indução em

processo de migração e invasão, *in vitro* e *in vivo*, e associação com pior prognóstico em câncer pancreático (CAI, et al. 2017).

Ao analisar EPNs FP adultos a expressão proteica de LAMA2 e NELL2 não variou quando comparada às amostras pediátricas. Quatro de sete amostras, apresentaram marcação LAMA2+/NELL2- e o restante (3/7), marcação positiva ou negativa par ambos. Esses dados são contrários aos observados na literatura, porém trata-se de um n amostral pequeno. Além disso, a subdivisão desses subgrupos baseada na diferença de expressão proteica entre LAMA2 e NELL2 mostraram, até o momento, serem marcadores promissores para a caracterização dos subgrupos de EPN-FP em diferentes trabalhos (WITT et al., 2011; WANI et al. 2012; ARAKI et al., 2016; ZAKRZEWSKA et al., 2016), porém nenhum estudo validou o subgrupo imuno-histoquímico por outras metodologias. Nobusawa, Hirato e Yokoo (2014) citam que eles não foram bem sucedidos ao tentarem classificar amostra de EPN FP através do perfil e IHQ desses marcadores. Araki et al., 2016 descrevem que não encontraram resultados reprodutíveis utilizando o marcador NELL2 e conclui que este marcador não parece ser útil e robusto para uso na rotina clínica.

No que diz respeito as taxas de sobrevida dos pacientes Grupo A que foram submetidos a ressecção completa foram superiores quando comparada à ressecção incompleta. Dado semelhante foi encontrado por Ramaswamy e colaboradores (2016) ao analisar 820 casos e verificou que pacientes EPN FP Grupo A e B beneficiam da ressecção total e possuem sobrevidas ruim quando o tumor é ressecado, principalmente ao Grupo A, mesmo sendo submetido a radioterapia.

7 CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- As técnicas utilizadas possibilitaram classificar as amostras de ependimomas supratentoriais através da identificação das fusões *RELA* tipo 1 e 2 e *YAP1-MAMLD1*.
- Utilizando a mesma abordagem de identificação de fusões *RELA* e *YAP1* para ependimomas de fossa posterior, nenhuma amostra apresentou essas fusões gênicas;
- Por meio da técnica de IHQ utilizando anticorpos LAMA2, TNC e NELL2, encontrou-se um subgrupo de amostras com marcação LAMA2+/NELL-, sugestivas de serem Grupo A, enquanto o restante foram amostras Grupo não A e não B por apresentarem LAMA2 +/NELL2+ ou LAMA2 -/NELL2-. Pacientes do EPN FP Grupo A apresentaram uma expressão proteica predominante de TNC;
- A expressão gênica de *TNC* apresentaram correlação significativa com a imuno-marcação moderada e forte. A correlação positiva observada entre as expressão dos genes *LAMA2* e *TNC*, podem indicar uma expressão gênica específica de *LAMA2* e *TNC* em EPNs FP Grupo A. Assim como a correlação negativa entre *LAMA2* e *NELL2* pode enfatizar a expressão diferencial em amostras sugestivas do Grupo A;
- Análise dos dados clínicos dos pacientes de EPN demonstraram que o grau de ressecção cirúrgica foi a única variável clínica ligada a fator prognóstico e às taxas de sobrevida dos pacientes EPN FP Grupo A;
- Esta classificação molecular revela subgrupos tumorais distintos que não seriam obtidos pela análise histopatológica. A correlação clínica mostra desfechos clínicos diferentes entre os subgrupos, principalmente no que diz respeito ao grau de ressecção cirúrgica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SALAMEH, A. et al. Intracranial ependymoma associated with multiple endocrine neoplasia type 1. **J Endocrinol Invest**, v. 33, n. 5, p. 353-6, May 2010. ISSN 1720-8386. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20142633> >.

ANDREIUOLO, F. et al. Current and evolving knowledge of prognostic factors for pediatric ependymomas. **Future Oncol**, v. 9, n. 2, p. 183-91, Feb 2013. ISSN 1744-8301. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23414469> >.

ANDREIUOLO, F. et al. Integrating Tenascin-C protein expression and 1q25 copy number status in pediatric intracranial ependymoma prognostication: A new model for risk stratification. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0178351, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28617804> >.

ARAKI, A. et al. Chromosome 1q gain and tenascin-C expression are candidate markers to define different risk groups in pediatric posterior fossa ependymoma. **Acta Neuropathol Commun**, v. 4, n. 1, p. 88, 08 2016. ISSN 2051-5960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27550150> >.

ARMSTRONG, T. S. et al. Adult ependymal tumors: prognosis and the M. D. Anderson Cancer Center experience. **Neuro Oncol**, v. 12, n. 8, p. 862-70, Aug 2010. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20511182> >.

BRANDES, A. A. et al. A multicenter retrospective study of chemotherapy for recurrent intracranial ependymal tumors in adults by the Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia. **Cancer**, v. 104, n. 1, p. 143-8, Jul 2005. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15912507> >.

BUCCOLIERO, A. M. et al. Merlin expression in pediatric anaplastic ependymomas real time PCR study. **Fetal Pediatr Pathol**, v. 29, n. 4, p. 245-54, 2010. ISSN 1551-3823. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594149> >.

CAI, J. et al. Tenascin-C induces migration and invasion through JNK/c-Jun signalling in pancreatic cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 43, p. 74406, 2017.

CACHIA, D. et al. C11orf95-RELA fusion present in a primary supratentorial ependymoma and recurrent sarcoma. **Brain Tumor Pathol**, v. 32, n. 2, p. 105-11, Apr 2015. ISSN 1861-387X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388523> >.

CHAMBERLAIN, M. C.; JOHNSTON, S. K. Temozolomide for recurrent intracranial supratentorial platinum-refractory ependymoma. **Cancer**, v. 115, n. 20, p. 4775-82, Oct 2009. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19569246> >.

CUEVAS-OCAMPO, A. K. et al. Genetic confirmation that ependymoma can arise as

part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) syndrome. **Acta Neuropathol**, v. 133, n. 4, p. 661-663, 04 2017. ISSN 1432-0533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28238068> >.

DE ANDRADE, F. G. et al. Immunohistochemical expression of cyclin D1 is higher in supratentorial ependymomas and predicts relapses in gross total resection cases. **Neuropathology**, v. 35, n. 4, p. 312-23, Aug 2015. ISSN 1440-1789. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25946121> >.

DE, B. et al. Patterns of relapse for children with localized intracranial ependymoma. **J Neurooncol**, v. 138, n. 2, p. 435-445, Jun 2018. ISSN 1573-7373. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29511977> >.

DUFFNER, P. K. et al. Postoperative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. **N Engl J Med**, v. 328, n. 24, p. 1725-31, Jun 1993. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8388548> >.

ELLISON, D. W. et al. Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts. **J Negat Results Biomed**, v. 10, p. 7, May 2011. ISSN 1477-5751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21627842> >.

FAN, L. et al. Silencing of ZNF139-siRNA induces apoptosis in human gastric cancer cell line BGC823. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 10, p. 12428-36, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722429> >.

FASSETT, D. R.; PINGREE, J.; KESTLE, J. R. The high incidence of tumor dissemination in myxopapillary ependymoma in pediatric patients. Report of five cases and review of the literature. **J Neurosurg**, v. 102, n. 1 Suppl, p. 59-64, Jan 2005. ISSN 0022-3085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16206735> >.

FIGARELLA-BRANGER, D. et al. Supratentorial clear cell ependymomas with branching capillaries demonstrate characteristic clinicopathological features and pathological activation of nuclear factor-kappaB signaling. **Neuro Oncol**, v. 18, n. 7, p. 919-27, 07 2016. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26984744> >.

FUJITA, T. et al. Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B. **Genes Dev**, v. 6, n. 5, p. 775-87, May 1992. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1577272> >.

GATTA, G. et al. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EURO CARE-5--a population-based study. **Lancet Oncol**, v. 15, n. 1, p. 35-47, Jan 2014. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24314616> >.

GASPAR, N. et al. p53 Pathway dysfunction in primary childhood ependymomas.

Pediatr Blood Cancer, v. 46, n. 5, p. 604-13, May 2006. ISSN 1545-5009.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16086408> >.

GESSI, M. et al. Role of Immunohistochemistry in the Identification of Supratentorial C11ORF95-RELA Fused Ependymoma in Routine Neuropathology. **Am J Surg Pathol**, Dec 20 2017. ISSN 0147-5185.

GILBERT, M. R.; RUDA, R.; SOFFIETTI, R. Ependymomas in adults. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 10, n. 3, p. 240-7, May 2010. ISSN 1534-6293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425040> >.

GODFRAIND, C. et al. Distinct disease-risk groups in pediatric supratentorial and posterior fossa ependymomas. **Acta Neuropathol**, v. 124, n. 2, p. 247-57, Aug 2012. ISSN 1432-0533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22526017> >.

GOJO, J. et al. Telomerase activation in posterior fossa group A ependymomas is associated with dismal prognosis and chromosome 1q gain. **Neuro Oncol**, v. 19, n. 9, p. 1183-1194, Sep 2017. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28371821> >.

GRAMATZKI, D. et al. Chemotherapy for intracranial ependymoma in adults. **BMC Cancer**, v. 16, p. 287, Apr 2016. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27108407> >.

GREEN, R. M. et al. Bevacizumab for recurrent ependymoma. **Neurology**, v. 73, n. 20, p. 1677-80, Nov 2009. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917990> >.

GUPTA, K.; SALUNKE, P. Understanding Ependymoma Oncogenesis: an Update on Recent Molecular Advances and Current Perspectives. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 1, p. 15-21, 01 2017. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26712502> >.

HEALEY, E. A. et al. The prognostic significance of postoperative residual tumor in ependymoma. **Neurosurgery**, v. 28, n. 5, p. 666-71; discussion 671-2, May 1991. ISSN 0148-396.

HAEMMERLE, M.; GUTSCHNER, T. Long non-coding RNAs in cancer and development: where do we go from here? **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 1, p. 1395-405, Jan 8 2015. ISSN 1422-0067.

HAMILTON, R. L.; POLLACK, I. F. The molecular biology of ependymomas. **Brain Pathol**, v. 7, n. 2, p. 807-22, Apr 1997. ISSN 1015-6305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9161731> >.

HIROSE, Y. et al. Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups. **Am J Pathol**, v. 158, n. 3, p. 1137-43, Mar 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238062> >.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. **Mol Cancer**, v. 12, p. 86, Aug 2 2013. ISSN 1476-4598.

HOFFMAN, L. M. et al. Molecular sub-group-specific immunophenotypic changes are associated with outcome in recurrent posterior fossa ependymoma. **Acta Neuropathol**, v. 127, n. 5, p. 731-45, May 2014. ISSN 0001-6322.

HORN, B. et al. A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 21, n. 3, p. 203-11, 1999 May-Jun 1999. ISSN 1077-4114. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363853> >.

HUANG, B. et al. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. **Cell Signal**, v. 22, n. 9, p. 1282-90, Sep 2010. ISSN 0898-6568.

HUANG, D. et al. C11orf95-MKL2 is the resulting fusion oncogene of t(11;16)(q13;p13) in chondroid lipoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 49, n. 9, p. 810-8, Sep 2010. ISSN 1045-2257.

JAIN, A. et al. Subependymoma: clinical features and surgical outcomes. **Neurol Res**, v. 34, n. 7, p. 677-84, Sep 2012. ISSN 1743-1328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747714> >.

JEN, J. et al. Oncoprotein ZNF322A transcriptionally deregulates alpha-adducin, cyclin D1 and p53 to promote tumor growth and metastasis in lung cancer. **Oncogene**, v. 36, n. 36, p. 5219, 09 2017. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28628114> >.

JEN, J.; WANG, Y. C. Zinc finger proteins in cancer progression. **J Biomed Sci**, v. 23, n. 1, p. 53, Jul 2016. ISSN 1423-0127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27411336> >.

JUNG, T. Y. et al. Treatment Decisions of World Health Organization Grade II and III Ependymomas in Molecular Era. **J Korean Neurosurg Soc**, v. 61, n. 3, p. 312-318, May 2018. ISSN 2005-3711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29742878> >.

KARIN, M. The I kappa B kinase - a bridge between inflammation and cancer. **Cell Res**, v. 18, n. 3, p. 334-42, Mar 2008. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18301380> >.

KARIN, M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 5, p. a000141, Nov 2009. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20066113> >.

KATZ, S. Y. et al. Ependymomas arising outside of the central nervous system: A case series and literature review. **J Clin Neurosci**, v. 47, p. 202-207, Jan 2018.

ISSN 1532-2653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054328> >.

KHATUA, S.; RAMASWAMY, V.; BOUFFET, E. Current therapy and the evolving molecular landscape of paediatric ependymoma. **Eur J Cancer**, v. 70, p. 34-41, 01 2017. ISSN 1879-0852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27866097> >.

KILDAY, J. P. et al. Pediatric ependymoma: biological perspectives. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 6, p. 765-86, Jun 2009. ISSN 1557-3125. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19531565> >.

KORSHUNOV, A.; GOLANOV, A.; SYCHEVA, R. Immunohistochemical markers for prognosis of anaplastic astrocytomas. **J Neurooncol**, v. 58, n. 3, p. 203-15, Jul 2002. ISSN 0167-594X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12187956> >.

KORSHUNOV, A. et al. The histologic grade is a main prognostic factor for patients with intracranial ependymomas treated in the microneurosurgical era: an analysis of 258 patients. **Cancer**, v. 100, n. 6, p. 1230-7, Mar 2004. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15022291> >.

KORSHUNOV, A. et al. Molecular staging of intracranial ependymoma in children and adults. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 19, p. 3182-90, Jul 2010. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516456> >.

KURIAN, K. M. et al. Genome-wide analysis of subependymomas shows underlying chromosomal copy number changes involving chromosomes 6, 7, 8 and 14 in a proportion of cases. **Brain Pathol**, v. 18, n. 4, p. 469-73, Oct 2008. ISSN 1015-6305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18397339> >.

LATYSHEVA, N. S.; BABU, M. M. Discovering and understanding oncogenic gene fusions through data intensive computational approaches. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. 10, p. 4487-503, Jun 2016. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27105842> >.

LEE, C. H. et al. The Similarities and Differences between Intracranial and Spinal Ependymomas : A Review from a Genetic Research Perspective. **J Korean Neurosurg Soc**, v. 59, n. 2, p. 83-90, Mar 2016. ISSN 2005-3711 (Print) 1225-8245.

LEHMAN, N. L. Central nervous system tumors with ependymal features: a broadened spectrum of primarily ependymal differentiation? **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 67, n. 3, p. 177-88, Mar 2008. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18344909> >.

LI, C. H.; CHEN, Y. Targeting long non-coding RNAs in cancers: progress and prospects. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 8, p. 1895-910, Aug 2013. ISSN 1878-

5875. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748105> >.

LI, Y. et al. Fam118B, a newly identified component of Cajal bodies, is required for Cajal body formation, snRNP biogenesis and cell viability. **J Cell Sci**, v. 127, n. Pt 9, p. 2029-39, May 2014. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569877> >.

LI et al. High expression of Zinc-finger protein X-linked is associated with reduced E-cadherin expression and unfavorable prognosis in nasopharyngeal carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 4, p. 3919-27, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26097576> >.

LIMA, E. R. et al. Análise de sobrevida de pacientes portadores de tumores do sistema nervoso central. **Rev Med Minas Gerais**, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print) 1046-2023.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 114, n. 2, p. 97-109, Aug 2007. ISSN 0001-6322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618441> >.

LOUIS, D.N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 6, p. 803-20, Jun 2016. ISSN 0001-6322.

LOURDUSAMY, A. et al. microRNA network analysis identifies miR-29 cluster as key regulator of LAMA2 in ependymoma. In: (Ed.). **Acta Neuropathol Commun**. England, v.3, 2015. p.26. ISBN 2051-5960.

LV, Q. L. et al. Upregulation of long noncoding RNA zinc finger antisense 1 enhances epithelial-mesenchymal transition in vitro and predicts poor prognosis in glioma. **Tumour Biol**, v. 39, n. 3, p. 1010428317695022, Mar 2017. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28349823> >.

MACK, S. C. et al. Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. **Nature**, v. 506, n. 7489, p. 445-50, Feb 27 2014. ISSN 0028-0836.

MACK, S. C. et al. Therapeutic targeting of ependymoma as informed by oncogenic enhancer profiling. **Nature**, v. 553, n. 7686, p. 101-105, 01 2018. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29258295> >.

MACK, S. C.; TAYLOR, M. D. Put away your microscopes: the ependymoma molecular era has begun. **Curr Opin Oncol**, v. 29, n. 6, p. 443-447, Nov 2017. ISSN 1531-703X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28885433> >.

MALGULWAR, P. B. et al. C11orf95-RELA fusions and upregulated NF-KB signalling characterise a subset of aggressive supratentorial ependymomas that

express L1CAM and nestin. *J Neurooncol*, v. 138, n. 1, p. 29-39, May 2018. ISSN 0167-594x.

MARTUZA, R. L.; ELDRIDGE, R. Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). **N Engl J Med**, v. 318, n. 11, p. 684-8, Mar 17 1988. ISSN 0028-4793.

MCGUIRE, C. S.; SAINANI, K. L.; FISHER, P. G. Both location and age predict survival in ependymoma: a SEER study. *Pediatr Blood Cancer*, v. 52, n. 1, p. 65-9, Jan 2009. ISSN 1545-5017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19006249> >.

MERCHANT, T. E. et al. Conformal radiotherapy after surgery for paediatric ependymoma: a prospective study. *Lancet Oncol*, v. 10, n. 3, p. 258-66, Mar 2009. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274783> >.

MERCHANT, T. E. Current Clinical Challenges in Childhood Ependymoma: A Focused Review. **J Clin Oncol**, v. 35, n. 21, p. 2364-2369, Jul 2017. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28640697> >.

MITRA, S. A.; MITRA, A. P.; TRICHE, T. J. A central role for long non-coding RNA in cancer. **Front Genet**, v. 3, p. 17, 2012. ISSN 1664-8021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363342> >.

MODENA, P. et al. Identification of tumor-specific molecular signatures in intracranial ependymoma and association with clinical characteristics. *J Clin Oncol*, v. 24, n. 33, p. 5223-33, Nov 2006. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114655> >.

MORK, S. J.; LOKEN, A. C. Ependymoma: a follow-up study of 101 cases. **Cancer**, v. 40, n. 2, p. 907-15, Aug 1977. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/890671> >.

MULLINS, K. J. et al. Malignant ependymomas in a patient with Turcot's syndrome: case report and management guidelines. **Surg Neurol**, v. 49, n. 3, p. 290-4, Mar 1998. ISSN 0090-3019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9508117> >.

NAKAMURA, T. et al. Encouraging option of multi-staged gross total resection for a C11orf-RelA fusion-positive supratentorial anaplastic ependymoma. **Brain Tumor Pathol**, v. 34, n. 4, p. 160-164, Oct 2017. ISSN 1861-387X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28831588> >.

NAKAMURA, Y. et al. The GAS5 (growth arrest-specific transcript 5) gene fuses to BCL6 as a result of t(1;3)(q25;q27) in a patient with B-cell lymphoma. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 182, n. 2, p. 144-9, Apr 15 2008. ISSN 0165-4608 (Print) 0165-4608.

NOBUSAWA, S.; HIRATO, J.; YOKOO, H. Molecular genetics of ependymomas and pediatric diffuse gliomas: a short review. **Brain Tumor Pathol**, v. 31, n. 4, p. 229-33,

Oct 2014. ISSN 1861-387X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182241> >.

OLSEN, T. K. et al. Fusion genes with ALK as recurrent partner in ependymoma-like gliomas: a new brain tumor entity? **Neuro Oncol**, v. 17, n. 10, p. 1365-73, Oct 2015. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795305> >.

OTA, T. et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. **Nat Genet**, v. 36, n. 1, p. 40-5, Jan 2004. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14702039> >.

OZAWA, T. et al. A De Novo Mouse Model of C11orf95-RELA Fusion-Driven Ependymoma Identifies Driver Functions in Addition to NF- κ B. **Cell Rep**, v. 23, n. 13, p. 3787-3797, Jun 2018. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29949764> >.

PAJTLER, K. W. et al. Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. **Cancer Cell**, v. 27, n. 5, p. 728-43, May 2015. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25965575> >.

PAJTLER, K. W. et al. The current consensus on the clinical management of intracranial ependymoma and its distinct molecular variants. **Acta Neuropathol**, v. 133, n. 1, p. 5-12, Jan 2017. ISSN 1432-0533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27858204> >.

PAJTLER, K. W. et al. Molecular heterogeneity and CXorf67 alterations in posterior fossa group A (PFA) ependymomas. **Acta Neuropathol**, Jun 2018. ISSN 1432-0533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29909548> >.

PALM, T. et al. Expression profiling of ependymomas unravels localization and tumor grade-specific tumorigenesis. **Cancer**, v. 115, n. 17, p. 3955-68, Sep 2009. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19536879> >.

PANAGOPOULOS, I. et al. Fusion of ZMYND8 and RELA genes in acute erythroid leukemia. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63663, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23667654> >.

PARKER, M. et al. C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-kappaB signalling in ependymoma. **Nature**, v. 506, n. 7489, p. 451-5, Feb 27 2014. ISSN 0028-0836.

PAULINO, A. C.; WEN, B. C. The significance of radiotherapy treatment duration in intracranial ependymoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 47, n. 3, p. 585-9, Jun 2000. ISSN 0360-3016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837939> >.

PIETSCH, T. et al. Supratentorial ependymomas of childhood carry C11orf95-RELA fusions leading to pathological activation of the NF-kappaB signaling pathway. **Acta Neuropathol**, v. 127, n. 4, p. 609-11, Apr 2014. ISSN 0001-6322.

POLLACK, I. F. et al. Intracranial ependymomas of childhood: long-term outcome and prognostic factors. **Neurosurgery**, v. 37, n. 4, p. 655-66; discussion 666-7, Oct 1995. ISSN 0148-396X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8559293> >.

PRENSNER, J. R. et al. Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. **Nat Biotechnol**, v. 29, n. 8, p. 742-9, Jul 2011. ISSN 1546-1696. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804560> >.

PUGET, S. et al. Candidate genes on chromosome 9q33-34 involved in the progression of childhood ependymomas. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 11, p. 1884-92, Apr 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289631> >.

PURDY, E. et al. Ependymoma in children under the age of 3 years: a report from the Canadian Pediatric Brain Tumour Consortium. **J Neurooncol**, v. 117, n. 2, p. 359-64, Apr 2014. ISSN 1573-7373. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532240> >.

RAGHUNATHAN, A. et al. Histological predictors of outcome in ependymoma are dependent on anatomic site within the central nervous system. **Brain Pathol**, v. 23, n. 5, p. 584-94, Sep 2013. ISSN 1750-3639. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452038> >.

RAMASWAMY, V. et al. Therapeutic Impact of Cytoreductive Surgery and Irradiation of Posterior Fossa Ependymoma in the Molecular Era: A Retrospective Multicohort Analysis. **J Clin Oncol**, v. 34, n. 21, p. 2468-77, Jul 2016. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27269943> >.

RENI, M. et al. Ependymoma. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 63, n. 1, p. 81-9, Jul 2007. ISSN 1040-8428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17482475> >.

ROUSSEAU, P. et al. Treatment of intracranial ependymomas of children: review of a 15-year experience. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 28, n. 2, p. 381-6, Jan 1994. ISSN 0360-3016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276653> >.

RUBIO, M. P. et al. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas. **Cancer Res**, v. 54, n. 1, p. 45-7, Jan 1994. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8261460> >.

RUDÀ, R. et al. Temozolomide as salvage treatment for recurrent intracranial ependymomas of the adult: a retrospective study. **Neuro Oncol**, v. 18, n. 2, p. 261-8, Feb 2016. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26323606> >.

RUDÀ, R. et al. EANO guidelines for the diagnosis and treatment of ependymal tumors. *Neuro Oncol*, v. 20, n. 4, p. 445-456, Mar 27 2018. ISSN 1522-8517.

SARKAR, S. et al. ADAM-9 is a novel mediator of tenascin-C-stimulated invasiveness of brain tumor-initiating cells. **Neuro-oncology**, v. 17, n. 8, p. 1095-1105, Aug 2015.

SARKAR, S. et al. Activation of NOTCH signaling by tenascin-C promotes growth of human brain tumor-initiating cells. **Cancer Research**, v. 77, n. 12, p. 3231-3243, Jun 2017.

SALA, F. et al. Prognostic factors in childhood intracranial ependymomas: the role of age and tumor location. **Pediatr Neurosurg**, v. 28, n. 3, p. 135-42, Mar 1998. ISSN 1016-2291. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9705591> >.

SATO, M. et al. Progression-free survival of children with localized ependymoma treated with intensity-modulated radiation therapy or proton-beam radiation therapy. **Cancer**, v. 123, n. 13, p. 2570-2578, Jul 1 2017. ISSN 0008-543x.

SCHIFFER, D. et al. Ependymoma: internal correlations among pathological signs: the anaplastic variant. **Neurosurgery**, v. 29, n. 2, p. 206-10, Aug 1991. ISSN 0148-396X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1886658> >.

SCHIFFER, D. et al. Histologic prognostic factors in ependymoma. **Childs Nerv Syst**, v. 7, n. 4, p. 177-82, Aug 1991. ISSN 0256-7040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1933913> >.

SCHILD, S. E. et al. The results of radiotherapy for ependymomas: the Mayo Clinic experience. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 42, n. 5, p. 953-8, Dec 1998. ISSN 0360-3016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869215> >.

SHAHROUKI, P.; LARSSON, E. The non-coding oncogene: a case of missing DNA evidence? **Front Genet**, v. 3, p. 170, 2012. ISSN 1664-8021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22988449> >.

SOUWEIDANE, M. M.; BOUFFET, E.; FINLAY, J. The role of chemotherapy in newly diagnosed ependymoma of childhood. **Pediatr Neurosurg**, v. 28, n. 5, p. 273-8, May 1998. ISSN 1016-2291. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9732262> >.

SOWAR, K. et al. Predicting which children are at risk for ependymoma relapse. *J Neurooncol*, v. 78, n. 1, p. 41-6, May 2006. ISSN 0167-594X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16575538> >.

STÖRCH E. Über die pathologisch-anatomischen Vorgänge am Stützgerüst des Zentralnervensystems. **Virchow Arch**. 157, 127–171 (1899).

STÜBEN, G. et al. Postoperative radiotherapy of spinal and intracranial ependymomas: analysis of prognostic factors. **Radiother Oncol**, v. 45, n. 1, p. 3-10, Oct 1997. ISSN 0167-8140. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364625> >.

TAYLOR, M. D. et al. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. **Cancer Cell**, v. 8, n. 4, p. 323-35, Oct 2005. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226707> >.

TAYLOR, R. E. Review of radiotherapy dose and volume for intracranial ependymoma. **Pediatr Blood Cancer**, v. 42, n. 5, p. 457-60, May 2004. ISSN 1545-5009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15049020> >.

TIHAN, T. et al. The prognostic value of histological grading of posterior fossa ependymomas in children: a Children's Oncology Group study and a review of prognostic factors. **Mod Pathol**, v. 21, n. 2, p. 165-77, Feb 2008. ISSN 0893-3952.

TOMLINS, S. A. et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. **Nature**, v. 448, n. 7153, p. 595-9, Aug 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671502> >.

TORRES, C. F.; KORONES, D. N.; PILCHER, W. Multiple ependymomas in a patient with Turcot's syndrome. **Med Pediatr Oncol**, v. 28, n. 1, p. 59-61, Jan 1997. ISSN 0098-1532. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8950338> >.

TORRES, L. F. B. et al. ACHADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DE 22 CASOS. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 57, n. 2-A, p. 261-266, 1999.

TREMBLAY, A. M. et al. The Hippo transducer YAP1 transforms activated satellite cells and is a potent effector of embryonal rhabdomyosarcoma formation. **Cancer Cell**, v. 26, n. 2, p. 273-87, Aug 2014. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25087979> >.

TZARIDIS, T. et al. Low-dose Actinomycin-D treatment re-establishes the tumoursuppressive function of P53 in RELA-positive ependymoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 38, p. 61860-61873, Sep 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27556362> >.

VALOUEV, A. et al. Discovery of recurrent structural variants in nasopharyngeal carcinoma. **Genome Res**, v. 24, n. 2, p. 300-9, Feb 2014. ISSN 1549-5469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24214394> >.

WANI, K. et al. A prognostic gene expression signature in infratentorial ependymoma. **Acta Neuropathol**, v. 123, n. 5, p. 727-38, May 2012. ISSN 1432-0533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22322993> >.

WEST, C. R.; BRUCE, D. A.; DUFFNER, P. K. Ependymomas. Factors in clinical and diagnostic staging. **Cancer**, v. 56, n. 7 Suppl, p. 1812-6, Oct 1985. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4027918> >.

WITT, H. et al. Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma. **Cancer Cell**, v. 20, n. 2, p. 143-57, Aug 2011. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840481> >.

WOLFE, S. A.; NEKLUDOVA, L.; PABO, C. O. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 29, p. 183-212, 2000. ISSN 1056-8700. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940247> >.

WRIGHT, K. D.; GAJJAR, A. Current treatment options for pediatric and adult patients with ependymoma. **Curr Treat Options Oncol**, v. 13, n. 4, p. 465-77, Dec 2012. ISSN 1534-6277. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22798016> >.

WU, J.; ARMSTRONG, T. S.; GILBERT, M. R. Biology and management of ependymomas. **Neuro Oncol**, v. 18, n. 7, p. 902-13, 07 2016. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27022130> >.

YANG, L. et al. Evidence of a role for the novel zinc-finger transcription factor ZKSCAN3 in modulating Cyclin D2 expression in multiple myeloma. **Oncogene**, v. 30, n. 11, p. 1329-40, Mar 2011. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057542> >.

YANG, L. et al. Unbiased screening for transcriptional targets of ZKSCAN3 identifies integrin beta 4 and vascular endothelial growth factor as downstream targets. **J Biol Chem**, v. 283, n. 50, p. 35295-304, Dec 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18940803> >.

YAO, Y.; MACK, S. C.; TAYLOR, M. D. Molecular genetics of ependymoma. **Chin J Cancer**, v. 30, n. 10, p. 669-81, Oct 2011. ISSN 1000-467X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21959044> >.

ZACHAROULIS, S. et al. Treatment and outcome of children with relapsed ependymoma: a multi-institutional retrospective analysis. **Childs Nerv Syst**, v. 26, n. 7, p. 905-11, Jul 2010. ISSN 1433-0350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20039045> >.

ZAKRZEWSKA, M. et al. Altered MicroRNA Expression Is Associated with Tumor Grade, Molecular Background and Outcome in Childhood Infratentorial Ependymoma. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0158464, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390862> >.

ZULCH KJ. *Brain Tumors. Their Biology and Pathology*. SpringerVerlag, NY, USA (1986).

ANEXOS

Anexo I- Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP; Processo nº 15509/2016

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 04 de abril de 2017.

Ofício nº 1001/2017
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 15509/2016

Prezado Pesquisador,

O trabalho intitulado **“INTERAÇÃO ENTRE ALVOS TERAPÊUTICOS EMERGENTES E VIAS DE DESENVOLVIMENTO ASSOCIADAS À TUMORIGÊNESE: ÊNFASE EM NEOPLASIAS DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE” – Projeto de Pesquisa Versão 2 – 08/03/2017**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 447ª Reunião Ordinária realizada em 03/04/2017, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 – 09/03/2017.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. LUIZ GONZAGA TONE
Depto. de Puericultura e Pediatria

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo II- Imuno-histoquímica dos controles dos marcadores utilizados para classificação molecular de ependimoma FP. Seta em preto da marcação do corpo de neurônio. Acima magnificação original de 20X e abaixo de 40X.

Anexo III- Tabela com associações clínicas entre o subgrupo fusão YAP1 e pacientes com ausência de fusão RELA e YAP1.

Variável clínica n (%)	Fusão YAP1 (4)	Ausência de Fusão RELA e YAP1 (9)	p Valor
Idade			
Média de idade (anos)	0,8 (0,2-2)	8 (1,6-12)	
<3 anos	4 (100)	1 (11,1)	0,007
>3 anos	0 (0)	8 (88,9)	
Gênero			
Feminino	4 (100)	3 (33,3)	0,07
Masculino	0 (0)	6 (66,7)	
Grau histológico			
Grau II	1 (25)	1 (11,1)	1,00
Grau II	3 (75)	8 (88,9)	
Grau de ressecção			
Completa	4 (100)	6 (66,7)	0,49
Incompleta	0 (0)	3 (33,3)	
Recidiva			
Sim	3 (75)	5 (55,6)	1,00
Não	1 (25)	4 (44,4)	
Óbito			
Sim	1 (25)	3 (33,3)	1,00
Não	3 (75)	6 (66,7)	

Anexo IV- Tabela com associações clínicas entre o subgrupo Grupo A e pacientes Não Grupo A e B.

Variável clínica n (%)	Grupo A (26)	Não Grupo A e B (4)	p Valor
Idade			
Média de idade (anos)	4,6 (0,5-13)	4,1 (1-8)	
<3 anos	11 (42,3)	2 (50)	1,00
>3 anos	15 (57,7)	2 (50)	
Gênero			
Feminino	14 (53,8)	3 (75)	0,61
Masculino	12 (46,2)	1 (25)	
Grau histológico			
Grau II	18 (69,2)	3 (75)	1,00
Grau II	8 (30,8)	1 (25)	
Grau de ressecção^a			
Completa	14 (56)	3 (75)	0,62
Incompleta	11 (44)	1 (25)	
Recidiva^b			
Sim	9 (37,5)	3 (75)	0,28
Não	15 (62,5)	1 (25)	
Óbito^c			
Sim	10 (43,5)	1 (33,3)	1,00
Não	13 (56,5)	2 (66,7)	

^a Um paciente do Grupo A não possui dados sobre o grau de ressecção cirúrgica.

^b Dois pacientes do Grupo A não apresentam dados sobre recidiva presente ou ausente.

^c Três pacientes do Grupo A e um paciente Não Grupo A e B não possuem dados sobre o desfecho clínico, se está vivo ou se foi a óbito.