Fernanda Gonçalves de Andrade

**Estudo das alterações na expressão gênica
dos ependimomas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
de título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientadora: Dra. Sueli Mieko Oba-Shinjo

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, Fernanda Gonçalves de

Estudo das alterações na expressão gênica dos ependimomas / Fernanda
Gonçalves de Andrade. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.

Orientadora: Sueli Mieko Oba-Shinjo.

Descritores: 1.Ependimoma/genética 2.Expressão gênica 3.Reação em
cadeia da polimerase em tempo real 4.Ciclina D1 5.Imuno-histoquímica
6.Análise serial de tecidos 7.Prognóstico 8.Marcadores biológicos de tumor
9.Estudos de associação genética 10.Glioma/genética 11.Neoplasias encefálicas
12.Neoplasias da medula espinhal/genética

USP/FM/DBD-129/14

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Nilva, pelo apoio, carinho
e compreensão incondicionais.

À Deus, pela sustentação nos momentos necessários.

AGRADECIMENTOS

Aos Mestres, tantos ao longo dessa vida, e de tantos tipos, agradeço o tempo dedicado ao ensino e à formação. Aos amigos e familiares, agradeço a compreensão e apoio nos diversos momentos dessa jornada. A toda equipe do LIM 15, agradeço a amizade, o apoio, os ensinamentos, a colaboração e a oportunidade para o desenvolvimento do presente estudo. Ao Prof. Dr. Sérgio Rosenberg, agradeço o auxílio na revisão das lâminas de patologia e na seleção dos casos deste estudo.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1	Dados epidemiológicos	6
3.2	Diagnóstico	7
3.2.1	Quadro clínico	7
3.2.2	Exames complementares	7
3.3	Patologia	8
3.4	Tratamento	10
3.4.1	Cirurgia	10
3.4.2	Radioterapia	11
3.4.3	Quimioterapia	12
3.5	Fatores prognósticos clínicos	13
3.5.1	Idade	14
3.5.2	Localização	15
3.5.3	Grau histológico	16
3.5.4	Extensão da ressecção	17
3.6	Características genéticas	18
4	MÉTODOS	32
4.1	Pacientes	33
4.2	Amostras de tecido	36
4.3	Análise da expressão gênica <i>in silico</i>	36
4.4	Validação dos resultados de <i>SAGE</i>	38
4.4.1	Extração de <i>RNA</i>	40
4.4.2	Transcrição reversa	40
4.4.3	PCR quantitativo em tempo real (<i>RT-qPCR</i>)	40
4.4.4	Expressão proteica de ciclina D1	44
4.5	Análises estatísticas	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Análise dos dados clínicos	47
5.2	Análise dos dados moleculares	51
5.3	Análise dos dados de expressão proteica	58
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	81
8	ANEXOS	83
8.1	Anexo 1	84
9	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH – *array comparative genomic hybridization*

APC – *adenomatous polyposis coli*

BMP – *bone morphogenetic protein*

CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CART – *Clasification and Regresion Tree*

CDK – *cyclin-dependent kinase* (ciclina dependente de quinase)

cDNA – *DNA complementar*

CERN – *Collaborative Ependymoma Research Network*

CGH – *comparative genomic hybridization*

CIMP – *CpG island methylator phenotype* (fenótipo com ilhas de CG metilado)

CNA – *copy number alteration*

cols. – colaboradores

C_T – *cycle threshold* (limiar do ciclo)

DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DP – desvio-padrão

EGFR – *epidermal growth factor receptor*

FGFR – *fibroblast growth factor receptor*

FISH – *fluorescence in situ hybridization*

FP – fossa posterior (infratentorial)

GBM – glioblastoma multiforme

GFAP – *glial fibrillary acidic protein*

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HDACi – *histone deacetylase inhibitor* (inibidor de histona deacetilase)

HOX – *homeobox*

iFISH – *Interphase Immunofluorescence in situ hybridization*

IGFBP – *insulin growth factor binding proteins*

IHQ – imuno-histoquímica

IM – intramedular

LI – *labeling index* (índice de marcação)

LIM – Laboratório de Investigação Médica

MCL - *mantle cell lymphoma* (linfoma de células do manto)

MEC – matriz extracelular

miRNA – *microRNA*

mTOR – *mammalian target of rapamycin*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NF2 – neurofibromatose tipo 2

NSC – *neural stem cells* (células-tronco neurais)

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – pares de base

PCR – *polymerase chain reation*

PNET – *primitive neuroectodermal tumor* (tumor neuroectodérmico primitivo)

Prof. – Professor

Rb – retinoblastoma

RefSeq – *reference sequence* (sequência de referência)

RGC – *radial glial cells* (células gliais radiais)

RNA – *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RSHP – *radial spoke head proteins*

RTK – *receptor tyrosine kinase* (receptor tirosino-quinase)

RT-qPCR – *quantitative real-time PCR*

SAGE – *Serial Analysis of Gene Expression*

SEER – *The Surveillance, Epidemiology and End Results*

SHH – *Sonic Hedgehog*

SNC – Sistema Nervoso Central

ST – supratentorial

STr - sulfonotransferase

TMA – *tissue microarray*

USP – Universidade de São Paulo

VEGF - *vascular endothelial growth factor*

WB – *Western Blot*

ZSV – zona subventricular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes da casuística de ependimomas e número de amostras de tecido congelado e tecido em parafina.....	35
Tabela 2 - Bibliotecas de <i>SAGE</i> utilizadas para a seleção de genes diferencialmente expressos em ependimomas	37
Tabela 3 - Genes selecionados <i>in silico</i> para análise de expressão gênica em ependimomas.....	39
Tabela 4 - Sequências de nucleotídeos dos <i>primers</i> (5'-3') e tamanho dos produtos de PCR (pares de base - pb) para análise de <i>RT-qPCR</i>	41
Tabela 5 - Dados das curvas de eficiência das reações de <i>RT-qPCR</i> de acordo com os genes estudados.....	42
Tabela 6 - Análise do tempo livre de progressão e de sobrevida de acordo com variáveis clínicas	48
Tabela 7 - Correlação de Spearman (valores de <i>r</i>) entre os níveis de expressão dos genes selecionados	51
Tabela 8 - Análise da distribuição da expressão gênica em relação a variáveis clínicas	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Curvas de amplificação da reação de *RT-qPCR* do gene *DNALI1* para determinação da eficiência 43
- Figura 2 -** Análise de eficiência da reação de *RT-qPCR* do gene *DNALI1* de acordo com as concentrações de *RNA* testadas. Valores de *slope* e *R* para o cálculo da eficiência de acordo com a fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ 43
- Figura 3 -** (A) histograma de distribuição da idade dos pacientes ao diagnóstico; gráficos de barras com a distribuição da idade de acordo com a (B) localização do tumor e (C) grau histológico; (D) distribuição do grau histológico de acordo com a localização. IM, intramedular; ST, supratentorial; FP, fossa posterior (infratentorial); GI, mixopapilar; GII, histologia clássica, GIII, histologia anaplásica 47
- Figura 4 -** Curvas de Kaplan-Meier mostrando o tempo livre de progressão acordo com (A) a idade, (B) a localização, (C) o grau histológico e (D) o grau de ressecção cirúrgica. Valores de *p* de acordo com teste log rank 49
- Figura 5 -** Curvas de Kaplan-Meier mostrando o tempo de sobrevida de acordo com (A/B) a localização, (C) o grau de ressecção cirúrgica e (D) a recidiva. Valores de *p* de acordo com teste log rank 50
- Figura 6 -** Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *CHST5* e (B) *IGF2* de acordo com a idade. Média representada por traço dentro da caixa e valores de *p* de acordo com teste Mann-Whitney 52
- Figura 7 -** Mapa de cores da expressão dos genes *CHST5* e *IGF2* de acordo com a idade dos pacientes na data da cirurgia. Matriz de cores com os valores mais altos representados em vermelho, mais baixos em verde e intermediários (mediana) em preto. Os menores de três anos de idade estão à direita do traço branco divisório no grupo da população pediátrica 52
- Figura 8 -** Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *ARMC3*, (B) *CHST5*, (C) *DNALI1*, (D) *IGF2* e (E) *RSHL3* de acordo com a localização. Média representada por traço dentro da caixa e valores de *p* de acordo com teste Mann-Whitney 53

- Figura 9** - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *ARMC3*, (B) *CHST5*, (C) *DNALI1* e (D) *RSHL3* de acordo com a localização. Média representada por traço dentro da caixa e valores de *p* de acordo com teste Kruskal-Wallis..... 54
- Figura 10** - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *CCND1*, (B) *FGFRL1*, (C) *IGF2* e (D) *NOTCH1* de acordo com a localização. Média representada por traço dentro da caixa e valores de *p* de acordo com teste Kruskal-Wallis..... 55
- Figura 11** - Mapa de cores da expressão dos genes de acordo com a localização da lesão. Matriz de cores com os valores mais altos representados em vermelho, mais baixos em verde e intermediários (mediana) em preto..... 55
- Figura 12** - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *CCND1*, (B) *FGFRL1*, (C) *IGF2* de acordo com o grau histológico. Média representada por traço dentro da caixa e valores de *p* de acordo com teste Mann-Whitney. O valor do caso mixopapilar é representado, porém não considerado para análise estatística 56
- Figura 13** - Mapa de cores da expressão dos genes de acordo com o grau histológico. Matriz de cores com os valores mais altos representados em vermelho, mais baixos em verde e intermediários (mediana) em preto..... 56
- Figura 14** - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *GNA13* de acordo com a idade e (B) *MSX1* de acordo com a localização. Média representada por traço dentro da caixa e valores de *p* de acordo com teste Mann-Whitney..... 57
- Figura 15** - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão de ciclina D1 de acordo com o índice de marcação (*LI*) proteica. Teste de correlação de Spearman. Negativa, *LI*= 0; focal, *LI*=1; fraco, *LI*= 2 ou 3; moderado, *LI*= 4 ou 6 e forte, *LI*= 9 ou 12 58
- Figura 16** - Casos representativos de ependimoma com imuno-histoquímica para ciclina D1. (A) intramedular, GII (*LI*=2); (B) intramedular, GIII (*LI*=9); (C) supratentorial, GII (*LI*=9); (D) supratentorial, GIII (*LI*=12); (E) infratentorial, GII (*LI*=2); (F) infratentorial GIII (*LI*=4). Aumento de 400x 59
- Figura 17** - Expressão proteica de ciclina D1 de acordo com índice de marcação em relação à localização (A - diagrama de caixa) intramedular vs intracraniana e (B - gráfico de dispersão) separando-se os casos intracranianos em supratentoriais e infratentoriais. IM, intramedular; IC intracraniano; ST, supratentorial; FP, fossa posterior (infratentorial)..... 60

- Figura 18** - Expressão proteica de ciclina D1 de acordo com índice de marcação em relação (A - diagrama de caixa) ao grau histológico e (B - gráfico de dispersão) correlacionando-se o grau histológico com a localização. GI, mixopapilar; GII, clássico; GIII, anaplásico; IM, intramedular; IC intracraniano; ST, supratentorial; FP, fossa posterior (infratentorial)..... 60
- Figura 19** - Expressão proteica de ciclina D1 de acordo com índice de marcação em relação (A - diagrama de caixa) idade e (B - gráfico de dispersão) correlacionando-se a idade com a localização. IM, intramedular; IC intracraniano; ST, supratentorial; FP, fossa posterior (infratentorial)..... 61
- Figura 20** - (A) Diagrama de caixa com a expressão proteica de ciclina D1 de acordo com índice de marcação em relação à recidiva. (B) Curvas de Kaplan-Meier mostrando o tempo livre de progressão de acordo com o índice de marcação da ciclina D1 (forte $L/I = 9$ ou 12 ; outros $L/I = 2$ a 6) 61
- Figura 21** - (A) Gráfico de dispersão com a expressão proteica de ciclina D1 de acordo com índice de marcação em relação à recidiva, estratificado pelo grau de ressecção cirúrgica. (B) Curvas de Kaplan-Meier mostrando o tempo livre de progressão de acordo com o índice de marcação da ciclina D1 (forte $L/I = 9$ ou 12 ; outros $L/I = 2$ a 6) para casos com ressecção cirúrgica completa.. 62

RESUMO

Andrade FG. *Estudo das alterações na expressão gênica dos ependimomas* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 112p.

Ependimomas são tumores gliais raros. Podem ser encontrados em qualquer localização do sistema nervoso central e, apesar de histologia similar, parecem apresentar alterações genômicas distintas. As variáveis clínicas são intercorrelacionadas e, geralmente, incapazes de predizer o curso da doença. O objetivo do presente estudo foi analisar a expressão aumentada de genes e proteínas em ependimomas e correlacionar com dados clínicos dos pacientes. Foram estudados casos de pacientes com ependimoma submetidos à ressecção cirúrgica no Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, no período entre 1996 e 2011 (33 amostras de tecido congelado para análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real e 149 amostras com tecido incluído em parafina, correspondentes a 121 casos devido a recidivas, para análise de proteína por imuno-histoquímica de *tissue microarrays*). As reações de imuno-histoquímica foram analisadas semiquantitativamente e graduadas com um índice de marcação calculado pelo produto da porcentagem de núcleos marcados pela intensidade de marcação. Oitenta e um casos eram adultos (média de 27,2 anos). Havia 60 casos intracranianos e 61 intramedulares, dos quais 10 eram mixopapilares, 92 grau II e 19 grau III. Ressecção completa foi possível em 62% dos casos e recidiva foi confirmada em 41,1%. Observou-se menor tempo para recidiva em crianças e tumores intracranianos, supratentoriais ($p < 0,001$ em ambos), histologia anaplásica e ressecções incompletas ($p < 0,05$ em ambos). Os seguintes genes foram selecionados em dados públicos de SAGE e literatura: *ARMC3*, *CCND1*, *CHST5*, *DNALI1*, *FGFRL1*, *GNA13*, *IGF2*, *MSX1*, *NOTCH1* e *RSPH3*. *ARMC3*, *RSHL3*, *CHST5* e *DNALI1* apresentaram maiores níveis de expressão em ependimomas intramedulares ($p < 0,05$), e *FGFRL1*, *NOTCH1* e *CCND1* nos casos supratentoriais ($p < 0,01$). *IGF2* apresentou maiores níveis de expressão em crianças e *CHST5* em adultos ($p < 0,05$ em ambos). Foram observados maiores níveis de expressão de *FGFRL1* ($p < 0,05$), *CCND1* e *IGF2* ($p < 0,01$ em ambos) em casos com histologia anaplásica. Nenhum dos genes analisados apresentou impacto no tempo livre de progressão ou na sobrevida. A expressão da proteína codificada por *CCND1*, ciclina D1, também foi avaliada por imuno-histoquímica, por ser uma proteína com expressão aumentada em diversos tipos de neoplasias e não ter ainda um valor prognóstico bem estabelecido em ependimomas. Houve correlação entre expressão de ciclina D1 a nível de *mRNA* e da proteína ($p < 0,0001$). As correlações entre ciclina D1 e histologia anaplásica e localização supratentorial foram confirmadas pela análise proteica ($p < 0,0001$ em ambos). Adicionalmente, foi também observada maior expressão de ciclina D1 em pacientes mais jovens ($p < 0,01$). A maior expressão de ciclina D1 em tumores com localização supratentorial foi independente do grau histológico e da idade do paciente. Recidiva foi mais frequente em casos com maiores níveis de expressão de ciclina D1 ($p < 0,05$), embora uma maior correlação com tempo livre de progressão foi observada apenas em casos com ressecção completa ($p < 0,001$). Os ependimomas apresentaram expressão gênica diferencial de acordo com idade, localização do tumor e grau histológico nesse estudo. A determinação dos níveis da expressão de ciclina D1 pode ser útil para guiar o seguimento e tratamento dos casos supratentoriais com ressecções completas.

Descritores: Ependimoma/genética; Expressão gênica; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Ciclina D1; Imuno-histoquímica; Análise serial de tecidos; Prognóstico; Marcadores biológicos de tumor; Estudos de associação genética; Glioma/genética; Neoplasias encefálicas; Neoplasias da medula espinal/genética.

ABSTRACT

Andrade FG. *Study of gene expression alterations in ependymomas* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014. 112p.

Ependymomas are rare glial cell-derived tumors. They can be found in any central nervous system localization and despite the histological similarity, they seem to display distinct genomic abnormalities. Clinical variables are intercorrelated and they are usually unable to predict the disease course. We aimed to analyze increased gene and protein expression in ependymomas and to correlate with patients' clinical data. We studied patients with ependymoma submitted to surgical resections at Hospital das Clínicas, University of São Paulo, from 1996 to 2011 (33 fresh-frozen samples for gene expression analysis by quantitative real-time PCR and 149 formalin-fixed, paraffin-embedded samples, relative to 121 patients due to relapses, for protein analysis by tissue microarray immunohistochemistry). Immunohistochemical reactions were analyzed semi-quantitatively and scored with a labeling index (LI) calculated as the product of the percentage of the positively stained nuclei by the intensity of staining. Eighty-one cases were adults (mean 27.2 years). There were 60 intracranial and 61 spinal cases, of which 10 tumors were myxopapillary, 92 were grade II and 19 were grade III. Gross total resection was achieved in 62% of cases and relapse was confirmed in 41.4% of cases. We observed a shorter time to relapse in children and supratentorial intracranial tumor localization ($p < 0.001$ for both), anaplastic histology and incomplete resections ($p < 0.05$ for both). The following genes were selected based on public SAGE database and literature: *ARMC3*, *CCND1*, *CHST5*, *DNALI1*, *FGFRL1*, *GNA13*, *IGF2*, *MSX1*, *NOTCH1* and *RSPH3*. *ARMC3*, *RSHL3*, *CHST5* and *DNALI1* presented higher expression levels in intramedullary ependymomas ($p < 0.05$) and *FGFRL1*, *NOTCH1* and *CCND1* in supratentorial cases ($p < 0.01$). *IGF2* presented higher expression levels in pediatric cases and *CHST5* in adults cases ($p < 0.05$ in both). Higher expression levels of *FGFRL1* ($p < 0.05$), *CCND1* and *IGF2* ($p < 0.01$ for both) were observed in anaplastic histology cases. None of the genes impacted in progression free survival or overall survival of patients. The expression of protein codified by *CCND1*, cyclin D1, was also evaluated by immunohistochemistry, because its overexpression has been related with several types of neoplasias and its prognostic value has not yet been fully established in ependymomas. There was a correlation of cyclin D1 expression at *mRNA* and protein levels ($p < 0.0001$). Correlations between cyclin D1 and anaplastic histology and supratentorial localization were confirmed by protein analyses ($p < 0.0001$ for both parameters). Additionally, high expression of cyclin D1 was observed in younger patients ($p < 0.01$). The higher cyclin D1 expression in supratentorial tumor localization was independent of histological grade and age of patient. Relapse was more frequent in cases with higher cyclin D1 expression levels ($p < 0.05$) although correlation with progression free survival was just observed in gross total resection cases ($p < 0.001$). Ependymomas presented differential gene expression according to age, tumor localization and histological grade in our study. Determination of cyclin D1 expression levels may be useful to guide follow-up and treatment in supratentorial cases with gross total resection.

Descriptors: Ependymoma/genetics; Gene expression; Real-time polymerase chain reaction; Cyclin D1; Immunohistochemistry; Tissue array analysis; Prognosis; Tumor markers, biological; Genetic association studies; Glioma/genetics; Brain neoplasms; Spinal cord neoplasms

1 INTRODUÇÃO

Ependimomas são tumores primários do sistema nervoso central (SNC). Crescem a partir das células endimárias que revestem o sistema ventricular e o canal central da medula, podendo, ainda, estar presente na substância branca periventricular e no fillum terminale como resultado de restos fetais migrando para áreas periventriculares (Poppleton and Gilbertson 2007; Reni, Gatta et al. 2007; Lehman 2008). Podem acometer tanto o compartimento intracraniano como o intramedular, como, também, qualquer faixa etária, porém com características particulares de distribuição (Wright and Gajjar 2012).

O estudo dos endimomas tem sido de interesse tanto para os neurocirurgiões como para radioterapeutas e neurooncologistas. Seu tratamento é cirúrgico, sendo esse um passo essencial para evolução do paciente (McLaughlin, Marcus et al. 1998; Schwartz and McCormick 2000; Shim, Kim et al. 2009; Zacharoulis and Moreno 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010; Wright and Gajjar 2012). O manejo descrito após a cirurgia não é uniforme na literatura e o valor dos tratamentos adjuvantes, como radioterapia e quimioterapia, ainda é conflitante (Bouffet, Perilongo et al. 1998; Merchant and Fouladi 2005; Metellus, Barrie et al. 2007; Boop and Sgouros 2009; Merchant, Li et al. 2009; Wright and Gajjar 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010).

A falha das terapias correntes em controlar de 20 a 30% dos casos sugere que um melhor entendimento do comportamento biológico desse tumor é necessário (Messahel, Ashley et al. 2009; Zacharoulis, Ashley et al. 2010; Witt, Korshunov et al. 2012). Uma das dificuldades dos estudos é agrupar um número adequado de pacientes devido a menor incidência desse tumor em relação a outros tumores do sistema nervoso central (McGuire, Sainani et al. 2009; Zacharoulis and Moreno 2009; Yao, Mack et al. 2011; Amirian, Armstrong et al. 2012). Outra dificuldade é considerar todos os casos como uma única doença e não estratificar seu estudo de acordo com variáveis clínicas e, possivelmente, com características moleculares (McGuire, Sainani et al. 2009; Witt, Korshunov et al. 2012; Wright and Gajjar 2012). Uma maior compreensão e caracterização dos endimomas como doenças distintas provavelmente ajudará no desenvolvimento e na avaliação da resposta a futuras terapias.

2 OBJETIVOS

Esse estudo tem como objetivos:

- Analisar o impacto de fatores demográficos e clínicos no prognóstico dos pacientes operados com ependimomas;
- Identificar genes diferencialmente expressos em ependimomas e analisar a expressão em amostras de ependimomas congeladas;
- Analisar a expressão proteica de ciclina D1 em amostras de ependimomas fixados em parafina;
- Correlacionar os dados demográficos e clínicos com os resultados de expressão gênica;
- Correlacionar a expressão gênica e proteica de ciclina D1 entre si e com os dados demográficos e clínicos dos pacientes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Dados epidemiológicos

Ependimomas são raros em adultos e mais frequentes em crianças (Boop and Sgouros 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010). Representam de 3 a 6% de todos os tumores do SNC, de 8 a 10% das neoplasias na população pediátrica e de 3 a 5% dos tumores em adultos, considerando tanto as lesões intracranianas como intramedulares (Boop and Sgouros 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010). Um terço desses tumores é diagnosticado antes dos 3 anos e, nessa faixa etária, representam 30% das neoplasias primárias intracranianas, sendo a média de idade ao diagnóstico de 4 a 6 anos (McGuire, Sainani et al. 2009).

Na população pediátrica, 90% dos ependimomas são intracranianos, sendo um terço supratentorial e dois terços infratentorial (Zacharoulis and Moreno 2009). As lesões infratentoriais são mais frequentes em crianças com menor idade, enquanto que os tumores supratentoriais ocorrem em crianças com maior idade e adultos (McGuire, Sainani et al. 2009).

Os ependimomas medulares representam cerca de 30% de todos os ependimomas do SNC e 60% dos tumores intramedulares, porém são raros na população pediátrica. Representam, aproximadamente, 13% dos casos de ependimoma e 10% dos tumores intramedulares dessa faixa etária (Bagley, Wilson et al. 2009; Hsu, Pradilla et al. 2009). Podem acometer tanto a região cérvico-torácica quanto a região de cone medular e cauda equina (Benesch, Frappaz et al. 2012). A evolução dos ependimomas medulares na faixa etária pediátrica tende a ser mais agressiva, com maiores taxas de recidiva quando comparados com os casos em adultos (Chang, Choe et al. 2002; Benesch, Weber-Mzell et al. 2010; Feldman, Clark et al. 2013).

3.2 Diagnóstico

3.2.1 Quadro clínico

A história clínica não é específica, variando de acordo com a idade e a localização da lesão. A duração dos sintomas até o diagnóstico pode variar de 1 mês a 3 anos, sendo, geralmente, de 3 a 6 meses nos tumores intracranianos e cerca de 3 anos nas lesões intramedulares (Schwartz and McCormick 2000; Reni, Gatta et al. 2007; Andrade, de Aguiar et al. 2009).

3.2.2 Exames complementares

O exame inicial para lesões intracranianas, geralmente tomografia computadorizada, pode já identificar a presença do tumor, além da hidrocefalia associada (Segall, Zee et al. 1982; Armington, Osborn et al. 1985; Segall, Batnitzky et al. 1985). Após a identificação da lesão, realiza-se um estudo com ressonância magnética para uma melhor definição das margens tumorais e sua relação com as estruturas adjacentes (Yuh, Barkovich et al. 2009). Esse exame também é importante para o seguimento pós-operatório, definindo o grau de ressecção, possíveis recidivas ou recrescimentos tumorais, e para o planejamento do alvo para a radioterapia (Steinbok, Hentschel et al. 1996; Merchant and Fouladi 2005; Massimino, Solero et al. 2011).

Os pacientes com suspeita de lesão medular são, em geral, investigados apenas com ressonância magnética (Hsu, Pradilla et al. 2009). A ressonância magnética da coluna também é importante nas lesões intracranianas como parte do estadiamento, identificando-se sinais de disseminação da lesão, que pode acontecer em cerca de 5% dos casos (Shim, Kim et al. 2009).

3.3 Patologia

Ependimomas são considerados tumores gliais. A atual classificação dos tumores de origem ependimal, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Louis, Ohgaki et al. 2007), é:

- Grau I:
 - Ependimoma mixopapilar: ocorre quase exclusivamente na região de cone medular, cauda equina e fillum terminal, mas pode, raramente, ser encontrado em outras regiões do SNC; caracteriza-se por células cuboidais arranjadas ao redor de um centro fibrovascular com grandes áreas de mucina, com expressão de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) e ausência de citoqueratina; a atividade mitótica é baixa ou ausente e a arquitetura é descrita como “pele de leopardo”, quando vista em baixa magnificação;
 - Subependimoma: lesão intraventricular benigna de crescimento lento e prognóstico favorável, com poucos relatos de lesão intramedular; apresenta núcleo isomórfico em uma matriz fibrilar densa e abundante com microcistos, e baixo índice mitótico.
- Grau II:
 - Ependimoma: apresenta celularidade moderada, mitoses raras ou ausentes e morfologia nuclear monomórfica; a característica histológica é a presença de pseudorrosetas perivascularares e rosetas ependimais, proliferação endotelial rara e expressão de GFAP. Apresenta quatro variantes histológicas:
 - Celular;
 - Papilar;
 - Células claras;
 - Tanicítico.
- Grau III:
 - Ependimoma anaplásico: apresenta clara diferenciação ependimal com pseudorrosetas perivascularares, aumento de celularidade, atipia celular, mitoses frequentes, proliferação endotelial com atipia microvascular, além de necrose em pseudopaliçadas.

As pseudorosetas perivasculares são grupos de células radialmente organizadas ao redor de um vaso sanguíneo, sendo as áreas perivasculares zonas sem núcleos e compostas de processos celulares longos, filamentosos e eosinofílicos que se estendem da região do núcleo até o vaso sanguíneo central (Godfraind 2009). As rosetas endimais verdadeiras são células alinhadas ao redor de um lúmen verdadeiro, um canal central sem a presença de um vaso sanguíneo no centro, como na tentativa de recapitular o desenvolvimento do sistema ventricular (Lehman 2008; Godfraind 2009).

O diagnóstico diferencial entre o endimoma de grau II e grau III pode ser difícil pela ausência de critérios claramente estabelecidos e consenso entre patologistas (Tihan, Zhou et al. 2008; Godfraind 2009; Ellison, Kocak et al. 2011). Não há clara determinação se os endimomas anaplásicos originam-se da progressão ou degeneração maligna dos endimomas clássicos ou se ocorrem *de novo* (Gilbert, Ruda et al. 2010). Além disto, os endimomas podem não ser uniformes, apresentando variação histológica dentro da mesma lesão (Ellison, Kocak et al. 2011). As áreas de hiper celularidade podem ser difusas ou focais, podendo ser bem circunscritas e abruptas dentro de áreas menos celulares. Regiões anaplásicas apresentam alta taxa de mitoses, apesar de não haver um limiar para o diagnóstico com ampla aceitação. A presença de áreas focais de atipia celular e mitoses em atividade não são suficientes para o diagnóstico de anaplasia. Essas dificuldades têm levado a resultados controversos em relação à importância do grau histológico como fator prognóstico nos endimomas (Godfraind 2009; Zacharoulis and Moreno 2009; Ellison, Kocak et al. 2011).

Reações de imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpos que indicam atividade mitótica, como Ki-67 (MIB-1) e ciclina D1, e proliferação vascular com EGFR (*epidermal growth factor receptor*) foram estudados em séries de casos, algumas mostrando correlação inversa da expressão com a evolução (Prayson 1998; Korshunov, Golanov et al. 2002; Zamecnik, Snuderl et al. 2003; Wolfsberger, Fischer et al. 2004; Mendlzyk, Korshunov et al. 2006; Senetta, Miracco et al. 2011; Zawrocki, Izycka-Swieszewska et al. 2011; Modena, Buttarelli et al. 2012; Stephen, Sievert et al. 2012; Verma, Zhou et al. 2012; Moreno, Popov et al. 2013). As análises dos níveis de expressão gênica e

proteica, além da citogenética, são importantes para uma melhor estratificação dos ependimomas de acordo com sua biologia e como alternativa às dificuldades atuais de classificação (Korshunov, Witt et al. 2010; Godfraind, Kaczmarska et al. 2012; Raghunathan, Wani et al. 2013). Uma possível estratificação mais precisa desses pacientes permitiria identificar os casos que necessitam tratamentos mais agressivos e novas terapias.

O ependimoblastoma é, atualmente, classificado como um tumor neuroectodérmico primitivo (*PNET - primitive neuroectodermal tumor*), distinto da forma do ependimoma anaplásico. Este tumor é altamente infiltrativo e apresenta uma tendência de metastatizar dentro do SNC, sendo assim, associado com um pior prognóstico (Kleihues, Burger et al. 1993).

3.4 Tratamento

Os ependimomas, em geral, são doenças localmente invasivas, sendo a maioria das recorrências locais. A disseminação pelo SNC ocorre raramente e acarreta em pior prognóstico (Zacharoulis, Ashley et al. 2010). O tratamento é baseado em terapias para atingir o controle local da doença. Embora a ressecção completa seguida de radioterapia conformacional sejam os melhores tratamentos disponíveis até o momento, é pouco provável que eles melhorem drasticamente no futuro. Portanto, é necessário o desenvolvimento de quimioterápicos mais efetivos no controle da doença (Hsu, Pradilla et al. 2009; Merchant 2009; Shim, Kim et al. 2009; Wright and Gajjar 2009).

3.4.1 Cirurgia

A cirurgia tem um papel essencial, pois fornece tecido para diagnóstico histológico e influencia no controle da doença, sendo, atualmente, o único fator para melhora na sobrevida de acordo com o grau de ressecção (McLaughlin, Marcus et al. 1998; Schwartz and McCormick 2000; Shim, Kim et al. 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010; Wright and Gajjar 2012). Apesar da ressecção completa ser de grande importância no tratamento, é atingida somente em

cerca de 40 a 60% dos casos (Zacharoulis and Moreno 2009). A invasão do tronco cerebral ou medular, aderências às estruturas vasculares, nervos cranianos ou à superfície ventricular estão entre as causas para ressecção incompleta e maiores taxas de complicação (Waldron, Laperriere et al. 1993; Chang, Choe et al. 2002; Boop and Sgouros 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010).

3.4.2 Radioterapia

O impacto da radioterapia no seguimento dos pacientes não é endossado por dados estatísticos consistentes devido a poucos estudos controlados e randomizados (Reni, Gatta et al. 2007; Hsu, Pradilla et al. 2009; Merchant, Li et al. 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010). Seu uso, como parte do tratamento pós-operatório padrão, iniciou-se após estudo que mostrou uma melhora na sobrevida de 17% para 40% dos pacientes submetidos apenas à cirurgia para aqueles que foram submetidos à radioterapia pós-operatória (Mork and Loken 1977). Uma vez que o descontrole local da doença ainda é o fator mais significativo para a recorrência e baixa sobrevida, há um consenso de que a radioterapia deve ser parte do tratamento padrão para a maioria dos pacientes, principalmente para aqueles com ressecção incompleta e com ependimoma de alto grau histológico (Pollack, Gerszten et al. 1995; Merchant and Fouladi 2005; Rogers, Pueschel et al. 2005; Boop and Sgouros 2009; Bouffet, Tabori et al. 2009; Merchant, Li et al. 2009; Zacharoulis and Moreno 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010; Wright and Gajjar 2012; Oh, Ivan et al. 2013).

A opção por seguimento sem radioterapia é aceitável nos pacientes com ressecção completa, grau histológico não anaplásico, localização medular ou supratentorial e em crianças menores de 3 anos, reservando-se a radioterapia para casos com progressão da doença (Sgouros, Malluci et al. 1996; Schwartz and McCormick 2000; Little, Sheean et al. 2009; Sung, Lim do et al. 2012; Venkatramani, Dhall et al. 2012; Wright and Gajjar 2012).

Menos que 10% dos pacientes com ependimoma apresentam disseminação da doença ao diagnóstico e a maioria apresenta recidiva local, independente da localização do tumor primário ou do grau histológico (Goldwein, Glauser et al. 1990; Combs, Kelter et al. 2008; Messahel, Ashley et al. 2009; Wright and Gajjar 2012).

Protocolos anteriores preconizavam a irradiação de neuroeixo em todos os pacientes com lesão infratentorial ou com histologia anaplásica (Salazar, Castro-Vita et al. 1983; Vanuytsel and Brada 1991). Estudos retrospectivos falharam em mostrar benefícios da irradiação profilática do neuroeixo em ependimomas localizados. Atualmente, seu uso restringe-se a pacientes com evidências de disseminação, apesar dos estudos não mostrarem claros benefícios (Merchant, Haida et al. 1997; Combs, Kelter et al. 2008).

3.4.3 Quimioterapia

Até o momento, não há um papel definido do uso da quimioterapia no tratamento dos pacientes com ependimoma, sendo sua aplicação restrita a estudos clínicos, não fazendo parte do tratamento padrão inicial (Bouffet, Perilongo et al. 1998; Merchant and Fouladi 2005; Reni, Gatta et al. 2007; Bouffet, Tabori et al. 2009; Shim, Kim et al. 2009; Wright and Gajjar 2009; Wright and Gajjar 2012).

A maioria dos estudos é retrospectiva e envolve pacientes com doença recorrente. A taxa de resposta dos ependimomas a agentes únicos é de 11%, com menos que 5% dos casos mostrando resposta completa (Bouffet and Foreman 1999). Cisplatina mostrou ser o agente mais ativo dos quimioterápicos únicos já testados (Khan, D'Souza et al. 1982; Sexauer, Khan et al. 1985; Walker and Allen 1988; Goldwein, Glauser et al. 1990; Grundy, Wilne et al. 2007; Garvin, Selch et al. 2012). Naqueles raros pacientes que respondem à quimioterapia, não há um aumento significativo da sobrevida, mesmo nos casos submetidos à quimioterapia em associação ou em adição à radioterapia (Needle, Goldwein et al. 1997; Robertson, Zeltzer et al. 1998; Timmermann, Kortmann et al. 2000). Os estudos prospectivos com vários esquemas de quimioterapia também falham em mostrar resultados efetivos (Reni, Gatta et al. 2007; Zacharoulis and Moreno 2009; Garvin, Selch et al. 2012; Gururangan, Fangusaro et al. 2012; Wright and Gajjar 2012).

A quimioterapia em crianças menores de 5 anos é utilizada como tentativa de postergar a radioterapia e tentar evitar os efeitos deletérios tardios do seu uso no encéfalo em desenvolvimento (Donahue 1992; Constine,

Woolf et al. 1993; Grill, Le Deley et al. 2001; Mulhern, Merchant et al. 2004; Merchant, Kiehna et al. 2005; Grundy, Wilne et al. 2007; von Hoff, Kieffer et al. 2008; Bouffet, Tabori et al. 2009; Zacharoulis and Moreno 2009; Garvin, Selch et al. 2012). O uso de agentes-alvo baseados no padrão molecular do tumor ainda é pouco estudado e sem resultado efetivo (Wright and Gajjar 2009; Atkinson, Shelat et al. 2011; Shonka 2011; Benesch, Frappaz et al. 2012).

3.5 Fatores prognósticos clínicos

Muitos autores têm procurado fatores que podem predizer o prognóstico em um caso de ependimoma. A maioria das casuísticas é retrospectiva e inclui poucos pacientes devido à baixa incidência desse tipo de tumor. Além disso, os estudos foram realizados ao longo de diversas décadas, dificultando a interpretação dos resultados devido a mudanças na classificação e nos protocolos de tratamento ao longo do tempo. A consequência é que fatores prognósticos comprovadamente aceitos são insuficientes (Bouffet, Perilongo et al. 1998; Reni, Gatta et al. 2007; Bouffet, Tabori et al. 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010). O fator prognóstico mais importante, atualmente, é o grau de ressecção (Zacharoulis and Moreno 2009; Amirian, Armstrong et al. 2012). Outras variáveis importantes são a idade do paciente ao diagnóstico, a localização do tumor, o grau histológico e a extensão da doença ao diagnóstico (presença de disseminação liquórica) (Zacharoulis and Moreno 2009). Não há um sistema de estadiamento formalmente reconhecido, porém sabe-se que a disseminação leptomeníngea, apesar de rara, é importante (menos que 5% ao diagnóstico) (Zacharoulis, Ji et al. 2008).

Amirian e col. publicaram uma casuística baseada em banco de dados americano de informação sobre câncer (*The Surveillance, Epidemiology and End Results – SEER*) do período entre 1973 e 2007 (Amirian, Armstrong et al. 2012). Estudos anteriores também utilizaram essa mesma base de dados (McGuire, Sainani et al. 2009; Rodriguez, Cheung et al. 2009). Foram coletados dados de idade, sexo, raça e etnia, grau histológico, localização do

tumor, grau de ressecção, tempo de sobrevida (da data do diagnóstico até morte ou último seguimento) e uso de radioterapia em 2.802 pacientes com diagnóstico de ependimoma. A análise foi baseada em subgrupos divididos segundo idade (população pediátrica <18 anos e adultos >18 anos). Modelos de regressão de Cox e análises por CART (*Classification and Regression Tree*) foram utilizados para identificar preditores de mortalidade nessa população (Lemon, Roy et al. 2003). Os autores discutem a importância da análise multivariada e da estratificação com a finalidade de diminuir possíveis fatores de confusão e conclusões errôneas, já que os fatores estudados são clinicamente e biologicamente relacionados. Devido à raridade do tumor, a maioria das casuísticas apresenta subgrupos muito pequenos e não permite tais análises.

3.5.1 Idade

Uma correlação entre idade e prognóstico tem sido sugerida. A baixa incidência do tumor, as diferentes definições para a idade máxima pediátrica entre as várias casuísticas (variando entre 12 a 20 anos), além da heterogeneidade do grau histológico e localização do tumor entre os grupos não permitem conclusões definitivas (Reni, Gatta et al. 2007). Os ependimomas, em geral, são raros em adultos, principalmente na localização intracraniana, porém, é o tipo de tumor intramedular mais frequente (Schwartz and McCormick 2000; Chang, Choe et al. 2002; Reni, Brandes et al. 2004; Metellus, Barrie et al. 2007; McGuire, Sainani et al. 2009; Armstrong, Vera-Bolanos et al. 2010; Gilbert, Ruda et al. 2010). A maioria das casuísticas é da população pediátrica e de tumores intracranianos, embora com poucos pacientes (Shu, Sall et al. 2007; Tihan, Zhou et al. 2008; Boop and Sgouros 2009; Zacharoulis and Moreno 2009; Phi, Wang et al. 2012; Vaidya, Smee et al. 2012).

Em uma casuística grande com análise geral utilizando base de dados de câncer (*SEER*), demonstrou-se uma maior sobrevida em pacientes adultos (Rodriguez, Cheung et al. 2009; Amirian, Armstrong et al. 2012). Em análise com idade estratificada, os extremos de idade (<5 anos e >60 anos) mostraram pior evolução (Duffner, Krischer et al. 1998; Amirian, Armstrong et al. 2012;

Amirian, Armstrong et al. 2012). Em geral, quanto menor a idade, pior o prognóstico devido a fatores como o comportamento mais agressivo do tumor e mais complicações relacionadas tanto ao tratamento cirúrgico como às terapias adjuvantes (Tihan, Zhou et al. 2008). Muitos pacientes não realizam radioterapia antes dos 3 anos de idade devido às complicações tardias relacionadas à irradiação do cérebro em desenvolvimento (Duffner, Krischer et al. 1998; Merchant and Fouladi 2005).

3.5.2 Localização

O papel da localização também é controverso. Há um grande viés de análise com a idade, pois o tumor intramedular é mais frequente em adultos e o intracraniano, em crianças (Zacharoulis and Moreno 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010). Embora a histologia seja similar entre as lesões intramedulares e as intracranianas, o comportamento biológico é distinto, geralmente mais favorável nas intramedulares (Chang, Choe et al. 2002; Reni, Gatta et al. 2007; Amirian, Armstrong et al. 2012; Benesch, Frappaz et al. 2012). A evolução é mais incerta nas lesões intracranianas. A localização supratentorial é descrita como fator de pior prognóstico devido à característica mais infiltrativa no parênquima normal, dificultando a ressecção total (McLaughlin, Marcus et al. 1998; Korshunov, Golanov et al. 2004; Reni, Brandes et al. 2004; Metellus, Barrie et al. 2007). Outros autores, porém, relatam que pacientes com ependimomas da fossa posterior possuem pior prognóstico devido a sua ocorrência em pacientes mais jovens, a invasão de estruturas, como o tronco encefálico, o assoalho do quarto ventrículo, o ângulo ponto-cerebelar, e o envolvimento dos nervos cranianos e vasos, tornando a ressecção completa difícil (Shu, Sall et al. 2007; Tihan, Zhou et al. 2008; Phi, Wang et al. 2012; Vaidya, Smee et al. 2012). Em análise estratificada por idade, os fatores prognósticos foram distintos entre a população adulta e pediátrica: a localização supratentorial apresenta pior prognóstico nos adultos, enquanto que, na população pediátrica, a infratentorial foi pior (Amirian, Armstrong et al. 2012).

3.5.3 Grau histológico

A influência do grau histológico do tumor na sobrevida dos pacientes e na recidiva da doença ainda é controverso (Korshunov, Golanov et al. 2004; Tihan, Zhou et al. 2008; Godfraind 2009). A definição pouco precisa da OMS quanto aos critérios de malignidade e o fato de alguns ependimomas apresentarem variação histológica dentro da mesma lesão, com alguns nódulos de hiper celularidade, proliferação vascular e necrose, faz com que o grau de discrepância entre patologistas seja alto (Louis, Ohgaki et al. 2007; Godfraind 2009; Ellison, Kocak et al. 2011). Embora alguns estudos utilizem classificações próprias, com critérios de anaplasia mais precisos, além de revisões por mais de um patologista, os resultados são inconsistentes (Schiffer, Chio et al. 1991; Merchant, Jenkins et al. 2002; Korshunov, Golanov et al. 2004; Kurt, Zheng et al. 2006; Metellus, Barrie et al. 2007; Ellison, Kocak et al. 2011). Há, também, estudos com marcadores imuno-histoquímicos, porém sem resultados definitivos (Korshunov, Golanov et al. 2002; Zamecnik, Snuderl et al. 2003; Kuncova, Janda et al. 2009; Zawrocki, Izycka-Swieszewska et al. 2011).

As características histológicas dos ependimomas anaplásicos incluem atipia nuclear, atividade mitótica aumentada, aumento da celularidade, proliferação microvascular e/ou necrose (Louis, Ohgaki et al. 2007). Essas características para classificação de anaplasia não estão relacionadas com o comportamento biológico dos ependimomas (Schiffer, Chio et al. 1991). Em revisão por Godfraind e cols. (2009), os autores sugerem que a localização seja incluída na gradação histológica, além dos critérios específicos e relevantes de malignidade, variantes histológicas e biomarcadores na tentativa de ser relevante em prever a evolução dos pacientes. Em estudo mais recente, características histológicas específicas do tumor se correlacionaram com a localização de origem do ependimoma, reforçando a proposta de uma classificação que considere esse fator (Raghunathan, Wani et al. 2013).

Outro fator de confusão é o fato de que séries mais antigas ou que foram realizadas em um longo período de tempo podem não distinguir entre pacientes com ependimomas anaplásicos e ependimoblastomas, tumor de evolução distinta e pior prognóstico, classificado como *PNET* a partir da revisão da OMS de 1993 (Kleihues, Burger et al. 1993).

3.5.4 Extensão da ressecção

A extensão da ressecção tem sido proposta como um fator prognóstico independente. A ressecção completa leva a uma maior sobrevida em cinco anos comparada a uma ressecção subtotal ou a uma biópsia da lesão (Bouffet, Perilongo et al. 1998; Reni, Gatta et al. 2007; Tihan, Zhou et al. 2008; Boop and Sgouros 2009; Zacharoulis and Moreno 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010; Amirian, Armstrong et al. 2012; Benesch, Frappaz et al. 2012; Wright and Gajjar 2012; Andreiuolo, Ferreira et al. 2013; Cage, Clark et al. 2013). Em algumas séries de casos, o único e mais importante determinante de evolução nos casos de ependimomas na faixa etária pediátrica foi o grau de ressecção. A sobrevida em cinco anos em crianças com tumores ressecados totalmente é de 67 a 80%, enquanto que os com ressecção incompleta é de 22 a 47%. Semelhantemente, o tempo livre de progressão em cinco anos é maior nos casos de ressecção completa (51 a 75%) do que nos de ressecção incompleta (0 a 26%) (Nazar, Hoffman et al. 1990; Sutton, Goldwein et al. 1990; Healey, Barnes et al. 1991; Rousseau, Habrand et al. 1994; Pollack, Gerszten et al. 1995; Foreman, Love et al. 1996; Needle, Goldwein et al. 1997; Perilongo, Massimino et al. 1997; Robertson, Zeltzer et al. 1998; Horn, Heideman et al. 1999; Figarella-Branger, Civatte et al. 2000; Palma, Celli et al. 2000; Paulino, Wen et al. 2002; van Veelen-Vincent, Pierre-Kahn et al. 2002; Zamecnik, Snuderl et al. 2003; Kawabata, Takahashi et al. 2005; Shu, Sall et al. 2007; Tihan, Zhou et al. 2008; Merchant, Li et al. 2009; Benesch, Weber-Mzell et al. 2010; Venkatramani, Dhall et al. 2012).

A ausência de evidências do impacto da cirurgia na sobrevida pode estar relacionada com a avaliação não objetiva do grau de ressecção, ou seja, não comprovada por exames de ressonância pós-operatória, e por estudos que englobam pacientes operados antes da era microcirúrgica (Chang, Choe et al. 2002; Korshunov, Golanov et al. 2004; Reni, Gatta et al. 2007; Shim, Kim et al. 2009; Armstrong, Vera-Bolanos et al. 2010). Um estudo mostra que o cirurgião estima a extensão da ressecção de forma diferente dos exames radiológicos pós-operatórios em 32% dos pacientes (Healey, Barnes et al. 1991). A extensão da ressecção deve ser confirmada por ressonância magnética com

e sem contraste realizada até 72 horas após a cirurgia para evitar confusões na interpretação de artefatos pós-operatórios, sendo a ressecção completa definida como a ausência de tumor na ressonância pós-operatória (Steinbok, Hentschel et al. 1996). Considera-se uma ressecção quase completa quando se tem tumor visível na superfície do quarto ventrículo observado durante a cirurgia, porém não evidenciado na ressonância pós-operatória, ou quando o resíduo tumoral for de até 1,5 cm² (Robertson, Zeltzer et al. 1998; Sanford, Merchant et al. 2009). Em alguns estudos, utiliza-se o valor de até 0,5 cm de espessura para considerar uma ressecção próxima do total e valores acima desse como ressecção subtotal (Merchant and Fouladi 2005). O grau de ressecção completo, quando comprovado por exame de imagem pós-operatório, se correlacionou com um maior tempo livre de progressão em cinco anos (Healey, Barnes et al. 1991).

3.6 Características genéticas

Até recentemente, as pesquisas em ependimomas foram limitadas pelo pequeno número de tumores disponíveis para estudo, baixa resolução das técnicas citogenéticas, e a ausência de linhagens celulares e modelos animais (Yao, Mack et al. 2011). Com a melhora nas técnicas, o número de estudos descrevendo marcadores moleculares como ferramenta para estratificação dos ependimomas aumentou muito desde a última década, porém nenhum desses marcadores atingiu a prática clínica ou de rotina neuropatológica nem alterou decisões de tratamento (Kilday, Rahman et al. 2009; Grill, Bergthold et al. 2011; Witt, Korshunov et al. 2012; Andreiuolo, Ferreira et al. 2013).

Não há evidência de associação dos ependimomas com síndromes familiares (Yao, Mack et al. 2011). Há um aumento de incidência de ependimomas intramedulares na neurofibromatose tipo 2 (NF2), embora o risco de desenvolvimento de ependimomas intracranianos ou mixopapilares não seja maior (Ebert, von Haken et al. 1999; Schwartz and McCormick 2000). O gene *NF2* está localizado no cromossomo 22q (*merlin* - 22q12.2) e pacientes com mutações apresentam tendência a desenvolver diversos tumores no SNC.

Alterações no cromossomo 22, como monossomia ou perdas alélicas, variam nas casuísticas de ependimoma (tanto intracraniano como intramedular) de 26 a 71%, sugerindo a presença de outro gene supressor de tumor, distinto de *NF2*, nessa região (Weremowicz, Kupsky et al. 1992; Rubio, Correa et al. 1994; Hulsebos, Oskam et al. 1999; Ward, Harding et al. 2001; Ammerlaan, de Bustos et al. 2005; Buccoliero, Castiglione et al. 2010; Yao, Mack et al. 2011).

Há descrição de ependimomas em pacientes com a síndrome familiar de Li-Fraumeni (mutação germinativa do gene supressor de tumor da proteína p53, *TP53*) (Metzger, Sheffield et al. 1991; von Haken, White et al. 1996). Mutações somáticas de *TP53*, geralmente, não são encontradas nos ependimomas esporádicos, provavelmente por não ter um papel importante na sua patogênese (Fink, Rushing et al. 1996; Gaspar, Grill et al. 2006; Sharma, Ghara et al. 2009; Manasa, Uppin et al. 2012). Há escassos relatos de pacientes com síndrome de Turcot que desenvolvem ependimomas. Esses pacientes apresentam mutação germinativa do gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*), localizado no cromossomo 5, e, conseqüentemente, aumento da atividade da via de sinalização *Wnt* (Torres, Korones et al. 1997; Mullins, Rubio et al. 1998; Onilude, Lusher et al. 2006). Pacientes com a síndrome de neoplasia endócrina múltipla tipo 1, devido à mutação no cromossomo 11q13, podem apresentar ependimomas medulares (Kato, Uchimura et al. 1996). Algumas outras famílias com aumento da incidência de ependimomas foram relatadas, porém sem identificação da síndrome tumoral (Yao, Mack et al. 2011).

Há muitos estudos citogenéticos usando cariótipo ou *CGH* (*comparative genomic hybridization*) e *array CGH* (*aCGH*), mostrando numerosas e esparsas alterações cromossômicas, que incluem desde simples rearranjos até aberrações numéricas e estruturais de cariótipo encontradas em ependimomas de pacientes adultos e crianças (Reardon, Entekin et al. 1999; Zheng, Pang et al. 2000; Hirose, Aldape et al. 2001; Carter, Nicholson et al. 2002; Dyer, Prebble et al. 2002; Jeuken, Sprenger et al. 2002; Huang, Starostik et al. 2003; Rousseau, Palm et al. 2007; Kilday, Rahman et al. 2009; Schneider, Monoranu et al. 2009; Rousseau, Idbaih et al. 2010; Yao, Mack et al. 2011; Witt, Korshunov et al. 2012). A técnica de *CGH* envolve hibridização simultânea do *DNA* genômico do tumor e não tumoral, cada um com marcador fluorescente diferente. As diferenças na

intensidade da fluorescência entre as duas marcações ao longo de cada cromossomo identificam regiões de ganho ou perda genética dentro do genoma tumoral. Essa técnica é mais sensível que o cariótipo para encontrar perdas e ganhos de material genético (Kilday, Rahman et al. 2009). Uma melhor definição dessas regiões alteradas é avaliada por *aCGH*, constituindo um mapa mais fino da variação no número de cópias cromossômicas com melhor correlação com o nível de expressão gênica (Yao, Mack et al. 2011).

Os resultados de estudos de cariótipo e *CGH* foram analisados em metanálise (Kilday, Rahman et al. 2009). Dos 21 estudos que usavam o cariótipo como metodologia, 89,2% dos pacientes apresentavam alguma anomalia, sendo que a alteração no cromossomo 22 foi identificada em 30% dos casos e a do cromossomo 1q em 20%. Não houve diferenciação das alterações encontradas nos casos de pacientes pediátricos e adultos nesses estudos. Já na revisão dos estudos com uso de *CGH* e *aCGH* como metodologia, foi evidenciada uma clara distinção entre as alterações encontradas de acordo com idade e localização. As anomalias mais comuns nos pacientes pediátricos foram: ganhos nos cromossomos 1q, 7 e 9 e perdas nos 22, 3, 9q, 13q, 6q, 1p, 17 e 6; na população adulta, foram: ganhos nos 7, 9, 12, 5, 18, X e 2 e perdas nos 22/22q, 10, 13q, 6 e 14q (Zheng, Pang et al. 2000; Ward, Harding et al. 2001; Carter, Nicholson et al. 2002; Ammerlaan, de Bustos et al. 2005; Tamiolakis, Papadopoulos et al. 2006). A população adulta apresentou um maior número de alterações por pacientes que a pediátrica (7,5 vs 3,8). Um genoma “balanceado” foi encontrado em 36 a 58% dos pacientes pediátricos enquanto que em menos 10% dos adultos. As alterações encontradas na população pediátrica são semelhantes às dos tumores intracranianos, enquanto que as da população adulta se assemelham aos intramedulares (Hirose, Aldape et al. 2001; Dyer, Prebble et al. 2002; Korshunov, Neben et al. 2003; Taylor, Poppleton et al. 2005; Modena, Lualdi et al. 2006; Biernat and Zawrocki 2007; Kilday, Rahman et al. 2009; Korshunov, Witt et al. 2010; Rousseau, Idbaih et al. 2010; Kim, Huang et al. 2013).

Apesar das diversas alterações citogenéticas já conhecidas, pouca informação sobre oncogenes e vias moleculares responsáveis pelo desenvolvimento dos ependimomas são conhecidas. As alterações

cromossômicas amplas e localizadas em numerosos genes torna difícil discriminar alterações genéticas “geradoras” (*drivers*) das “passageiras” (*passengers*). O desenvolvimento do *microarray* e tecnologias de sequenciamento em larga escala têm permitido uma melhor correlação dos achados de perdas e ganhos de regiões cromossômicas com dados de expressão gênica (Yao, Mack et al. 2011).

No cromossomo 22q, outros genes estudados, além do *NF2*, são: *hSNF5/INI1* (sem alteração identificada); *RAC2* (pior sobrevida em menores 2 anos); hipoexpressão de *C22ORF2* (*CHIBBY*), *FBX7*, *CBX7* e *SBF1*; *SULTAN4A1* (Kraus, de Millas et al. 2001; Suarez-Merino, Hubank et al. 2005; Modena, Lualdi et al. 2006; Karakoula, Suarez-Merino et al. 2008). O cromossomo 1q apresenta ganho mais frequente na população pediátrica, em pacientes com idades menores que dois anos, nos tumores anaplásicos e com localização infratentorial. Os genes candidatos já estudados nessa região são: *DUSP12*, *laminin*, *PRELP*, *HSPA6*, *GAC1*, *CHI3L1*, *TPR*, *JTB*, *SHC1* e *S100A10* (Suarez-Merino, Hubank et al. 2005; Mendrzyk, Korshunov et al. 2006; Karakoula, Suarez-Merino et al. 2008; Rand, Prebble et al. 2008). A deleção de áreas do cromossomo 6q é mais comum em casos com localização infratentorial e concomitante hipoexpressão dos genes *SNX9*, *SYNJ2*, *AMD1*, *CDK11* e *SASH1* (Huang, Starostik et al. 2003; Suarez-Merino, Hubank et al. 2005; Monoranu, Huang et al. 2008). Deleções no cromossomo 9 são mais comuns nos tumores de localização supratentorial: *CDKN2A* (pior prognóstico); *DBC1*, *DEC1*, *LPAR1* e *TXN* (oncogenes descritos em outros tumores) (Huang, Starostik et al. 2003; Puget, Grill et al. 2009; Schneider, Monoranu et al. 2009; Korshunov, Witt et al. 2010). A identificação de ganho no cromossomo 7 pode estar relacionado com os genes: *EGFR*, *TWIST1*, *HDAC9* e *ARHGEF5* (Mendrzyk, Korshunov et al. 2006; Modena, Lualdi et al. 2006).

A expressão de receptores de membrana tirosino-quinase pertencentes à família Erb (*ERBB1* – *EGFR*; *ERBB2*, *ERBB3* e *ERBB4*) foi estudada por IHQ em 121 pacientes, a maioria da população pediátrica com tumores em localização infratentorial. O autor fez correlação da expressão dessas proteínas com dados clínicos de ressecção tumoral criando grupos de risco. Nesse estudo, pacientes com ressecção incompleta e coexpressão de Ki-67, *ERBB2* e

ERBB4 apresentaram pior prognóstico, sendo considerados grupo de alto risco. O autor sugere o uso substâncias inibidoras para *ERBB2* como alvo terapêutico nesses casos (Gilbertson, Bentley et al. 2002).

Outro estudo que utiliza a técnica de *CGH* em 68 amostras de ependimoma e IHQ por meio de *tissue microarray* (*TMA*) em 170 pacientes também encontra correlação entre pior prognóstico e maiores níveis de expressão proteica de *EGFR*. Esse estudo também identifica ganho no cromossomo 1q em ependimomas de pacientes pediátricos, com tumores anaplásicos, de localização intracraniana e com pior prognóstico (maior recorrência e mortalidade) (Mendrzyk, Korshunov et al. 2006).

Korshunov e cols. (2003) utilizaram a técnica de *microarray* para estudar 39 casos de ependimomas com amostras tanto intracraniana como intramedular, tanto pediátrica como adulta e de todos os graus histológicos. Foram estudados 2600 genes envolvidos com processos de mitose, controle do ciclo celular, apoptose e oncogenes conhecidos. Os dados foram correlacionados com achados citogenéticos e foram confirmados por *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativo em tempo real (*RT-qPCR*) e IHQ. Os 16 genes mais expressos foram: *CLU*, *AK1*, *RAF1*, *MMP12*, *SERPING1*, *FOXJ1*, *MSX1*, *CRYAB*, *PSAP*, *PCDGCH3*, *ITIH2*, *CETN2*, *IGF2*, *HLA-DRA*, *DNAJB2*, *GRM5*. O padrão de expressão gênica foi diferente de acordo com o grau histológico, a localização e a idade, sendo os genes *MSX1* e *IGF2* mais expressos em tumores com localização intracraniana, *FGFR* e *CCND1* nos anaplásicos, *HOXB5* nos intramedulares e *CDKN2A* com menor expressão nos supratentoriais.

Outro estudo, em 2005, utilizou-se, também, da técnica de *microarray* para estudar 12.000 genes em 19 amostras de ependimoma intracraniano em população pediátrica. Foram identificados 26 genes hiperexpressos (*COL4A1*, *IBP2*, *HOX7*, *Wee1*, *GAC1*, *WNT5A*, *FN1* e outros) e 84 hipoexpressos (*EB1*, *SCHIP-1* e outros). A correlação com *CGH* mostrou genes diferentemente expressos na região 22q (hipoexpressão de *FBX7*, *C22orf2*, *CBX7* e *SBF1*), 6q (hipoexpressão de *AMD1*, *CDK11* e *SASH1*) e 1q (hiperexpressão de *laminin*, *GAC1*). A expressão gênica foi confirmada por *RT-qPCR* em alguns casos. Não se encontraram alterações na expressão dos genes *EGFR*, *PDGF*,

PDGFR, *CDK2*, *Rb*, *MDM2* e *PTEN*, e não foram identificadas correlações clínicas (Suarez-Merino, Hubank et al. 2005).

Taylor e cols. (2005) utilizaram técnicas de *microarray* e *aCGH* em 29 amostras de ependimomas congelados, com maioria de localização intracraniana, histologia clássica e população pediátrica. Foram estudados 18.400 genes, sendo que os 1.000 genes que apresentavam maior variação foram selecionados para análise de bioinformática e agrupamentos não hierárquicos. Os achados moleculares foram validados por *TMA* em 71 casos de ependimomas fixado em parafina. Não houve correlação da idade e do grau histológico com os achados moleculares. Demonstrou-se que ependimomas de cada localização (supratentorial, infratentorial e intramedular) apresentam padrões distintos de expressão gênica que se correlacionam com perdas e ganhos em cromossomos. As características genéticas de cada um desses subgrupos se correlacionaram com o padrão de expressão gênica das células ependimárias normais que se desenvolvem a partir das células gliais radiais (*radial glial cells* – *RGC*) embriogênicas da zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais e do canal espinhal. Genes que foram diferentemente expressos de acordo com a localização: supratentorial – *CDKN2A*, *EPHB2/ 3/ 4*, *EPHRIN A3/ A4*, *CCNB2*, *CCND1*, *CCNG2*, *CDK2/ 4*, *CDKN1C/ 2C*, *Jagged 1/ 2*; intramedular – *HOXA7/A9/B6/B7/C10/C6*, *IGF1* e infratentorial – *ID1/2/4*, *AQP1/3/4*. Para os autores, os achados confirmam as observações prévias que ependimomas supratentoriais e medulares devem surgir a partir de populações diferentes de células progenitoras neurais. Os autores concluíram que, em ependimomas, essas células-tronco apresentam propriedades de autorrenovação e são totipotentes, podendo representar alvos celulares das mutações primárias que promovem a doença.

Os dados de *SAGE* (*Serial Analysis of Gene Expression*) e as técnicas de *aCGH* e *RT-qPCR* foram utilizados e correlacionados entre si em estudo com 24 pacientes com ependimoma intracraniano, em sua maioria, na população pediátrica. As alterações citogenéticas foram diferentes de acordo com a localização, com a idade, porém sem diferenciação quanto ao grau histológico. Os dados de *SAGE* identificaram genes e vias diferentemente expressas nos ependimomas: *NOTCH*, *Sonic hedgehog* (*SHH*), motilidade e

adesão celular (*ITGB1*, *EGFR*, *VIL2*, *CAPN2*, *MLC1*), estresse celular (*HSPB1*, *MAPKAPK3*, *BCL2*, *CDC2* e *FAS*), *MSX1*, *IGF2*, *EGF*, *ERBB3*, *SCR*, *ERBB2* e *DNALI1*. Houve concordância de 80 genes pelas análises de *aCGH* e *SAGE*, entre eles: hiperexpressão de *NOTCH1*, *HES1*, *TCF*, *RUVBL1*, *MLF1*, *VIL2/erzin*, *IGF2* e *ERBB2*, além de hipoexpressão de *THY1*, *GAP43* e *SCN3B* (Modena, Lualdi et al. 2006).

A técnica de *microarray* foi utilizada em outro estudo de 34 pacientes com ependimoma. A casuística era geral, englobando pacientes adultos e crianças, histologia de baixo e alto grau, localização tanto intracraniana como intramedular. A análise por bioinformática selecionou 457 genes divididos em quatro grupamentos distintos: grupamento I – tumores anaplásicos (vias de apoptose, angiogênese e vias de desenvolvimento da matriz extracelular), grupamento II – tumores clássicos grau II (vias de desenvolvimento do SNC e vias de tumorigênese), grupamento III – tumores intracranianos (vias de neurogênese, como a via *Notch* e via *SHH*) e grupamento IV – tumores intramedulares (família *homeobox* – *HOX*; desenvolvimento embrionário). Os autores procuram hipóteses para o papel de cada alteração no contexto das vias oncogênicas e no “concerto molecular” que leva à tumorigênese dos ependimomas. Sugerem que a ativação simultânea das vias *Notch* e *SHH* manteriam o estado de célula-tronco e direcionariam sua proliferação, e que a via *BMP* (*bone morphogenetic protein*) agiria na diferenciação morfogênética nos ependimomas intracranianos. No caso dos ependimomas extracranianos, haveria uma desregulação nos fatores de transcrição dos genes *HOX*, que coordenam o desenvolvimento do SNC e estão implicados na manutenção, proliferação e diferenciação das células-tronco. Um maior número de alterações cromossômicas na histologia clássica teria ligação com a alteração nas dineínas responsáveis pela formação do citoesqueleto e dos fusos mitóticos. Os ependimomas originados de qualquer um dos compartimentos (seja intracraniano ou intramedular) adquiririam o fenótipo anaplásico por desregulação da mesma via oncogênica, principalmente por menor funcionamento da *Wnt/β-catenin* (Palm, Figarella-Branger et al. 2009).

Korshunov e cols. (2010) utilizaram a técnica de *aCGH* em uma coorte de 122 pacientes e validaram os resultados em uma segunda coorte de 170

pacientes por meio de *TMA* e *FISH* (*fluorescence in situ hybridization*), ambas com tumores intracranianos, população tanto pediátrica como de adultos. Os autores observaram a presença de uma citogenética “balanceada” (nenhuma, ou de 1 a 3 alterações cromossômicas) em cerca de 50% dos casos, chegando a 70% nos pacientes com idade menor que 4 anos. Houve a proposta de um sistema de estadiamento molecular de acordo com os achados citogenéticos e com correlação com a sobrevida: grupo 1 - ganho nos cromossomos 9, 15, 18, e perda 6 sem alterações em 1q e sem perda *CDKN2A* (sobrevida de 100%); grupo 2 - genoma “balanceado” para os cromossomos 1, 9, 15, 18 e 6 sem deleção *CDKN2A* (sobrevida de 78%); e grupo 3 com ganho 1q ou deleção homozigoze de *CDKN2A* (sobrevida de 32%). A localização do tumor não apresentou correlação com o prognóstico, porém a idade pediátrica e a histologia anaplásica foram fatores independentes alterando a sobrevida e o tempo livre de doença. Os grupos citogenéticos propostos ultrapassaram os dados clínicos no sentido de predizer o prognóstico dos pacientes.

Johnson e cols. (2010) estudaram o *DNA* de 204 casos de ependimoma por meio de *copy number alteration* (*CNA*) e o *RNA* de 83 casos por meio de *microarray*. As amostras englobavam todas as localizações. Os dados foram analisados e integrados por bioinformática, validados com *RT-qPCR* ou *FISH*. Essa análise permitiu a formação de nove subgrupos: A, B, C e D de localização supratentorial, E de localização intramedular, F com características mistas intramedular e infratentorial, G, H e I de localização infratentorial. A validação da expressão gênica mostra: deleção de *CDKN2A*, amplificação de *NOTCH1*, deleção do cromossomo 22q, amplificação de outros 28 novos genes e 23 outras deleções. As variantes de ependimomas sugerem que há combinações de células-tronco neurais (*neural stem cells – NSC*) suscetíveis com mutações específicas.

Em 2011, duas coortes foram estudadas simultaneamente utilizando técnicas de *microarray* e *aCGH*, e seus achados validados em uma terceira coorte distinta utilizando *TMA*. A casuística nas coortes era geral para localização, grau histológico e idade. As análises de bioinformática foram utilizadas para a formação de grupamentos hierárquicos e identificação de

processos biológicos capazes de diferenciar os pacientes em grupos com prognósticos diferentes. Nos casos com tumores de localização infratentorial, dois grupos distintos foram identificados: grupo A – pacientes mais jovens, maior número de tumores laterais, maior frequência de ganho do cromossomo 1q e restante do genoma “balanceado”, marcador *LAMA2* (*laminin alpha 2*); grupo B – pacientes com tumores de linha média com várias alterações cromossômicas e marcador *NELL2* (*neural epidermal growth factor like 2*). O grupo A apresentava, ainda, aumento da expressão de genes relacionados a outros tipos de tumores, como *HIF-1alpha*, *VEGF*, *PDGF*, *MAPK*, *EGFR*, *TGF-Beta*, *RAS*, *GTPase*, *CHI3L1*, *TNC*, *ERRB4*, *BIRC5*, *S100A6*. O grupo B apresentou perfil semelhante ao dos tumores intramedulares com expressão de genes relacionados à ciliogênese e formação de microtúbulos e metabolismo mitocondrial/oxidativo. O grupo A apresentou menor sobrevida em relação ao grupo B (Witt, Mack et al. 2011).

Wani e cols. (2012) analisaram casos de quatro instituições diferentes dos Estados Unidos (estudo por meio de *CERN Foundation - Collaborative Ependymoma Research Network*) por meio de expressão gênica por *RT-qPCR* de 366 genes selecionados. Apenas casos intracranianos, infratentoriais foram estudados com intuito de validação dos grupos descritos por Witt e cols. em 2011. Havia pacientes tanto adultos como crianças, e casos de histologia clássica e anaplásica. Essa análise também dividiu os pacientes em dois grupos de acordo com a expressão diferencial de genes: grupo 1 – pacientes menores que 10 anos de idade, expressão de genes relacionados à cicatrização, inflamação, migração e adesão celular; grupo 2 – sem assinatura genética específica. Desses genes analisados, 51 mostraram ter correlação com recorrência, sendo 22 com recorrência precoce (<3 anos) e 29 com tardia (após 3 anos). Houve concordância dos genes para recorrência precoce com o grupo 1 (e grupo A de Witt) e daqueles de recorrência tardia com o grupo 2 (e grupo B de Witt). Entre esses genes de recorrência, os 10 genes relacionados à pior sobrevida e a menor tempo livre de doença foram: *MMP9*, *TOP2A*, *TKTL1*, *COL3A1*, *LAMB1*, *COL4A2* e *TGFBI* no grupo 1; *GRIA1*, *F5*, *SLC14A1* no grupo 2. Esses genes selecionados estão envolvidos com angiogênese, matriz extracelular e proliferação. O produto do gene *TOP2A* (topoisomerase II alpha)

foi analisado por IHQ apresentando correlação com menor sobrevida, porém esse dado não se mostrou um fator independente de fatores clínicos.

Em estudo de 2012, os autores aplicaram a estratificação proposta por Korshunov e cols. em 2010 em uma coorte de 146 pacientes com tumores intracranianos, a maioria da população era pediátrica. Foi utilizada a técnica de *iFISH* (*Interphase Immunofluorescence in situ hybridization*) para detecção do ganho de 1q e perda de *CDKN2A* no cromossomo 9p. Apenas 2 pacientes apresentavam deleção em *CDKN2A*. Os pacientes foram divididos em grupos de risco de acordo com dados clínicos e citogenéticos: baixo risco – ressecção completa do tumor, baixa densidade celular no estudo histológico e sem ganho 1q; alto risco – ressecção subtotal, alta densidade celular e ganho 1q; intermediário – pacientes que não apresentam as características dos grupos de alto e baixo risco. A localização infratentorial, a ressecção incompleta, a presença de alta densidade celular e o ganho no cromossomo 1q foram fatores prognósticos independentes. Não houve correlação prognóstica quando os pacientes foram divididos de acordo com os grupos propostos por Korshunov em 2010, provavelmente devido a poucos pacientes apresentarem deleções de *CDKN2A* (Godfraind, Kaczmariska et al. 2012).

Alguns autores estudaram a influência prognóstica da telomerase e de sua subunidade enzimática (hTERT) nos ependimomas (Mendrzyk, Korshunov et al. 2006; Tabori, Ma et al. 2006; Tabori, Wong et al. 2008; Zawrocki, Izycka-Swieszewska et al. 2011; Modena, Buttarelli et al. 2012). Os telômeros são estruturas ao final dos cromossomos cuja função é servir como um “tampão” impedindo que esse final seja reconhecido pelo organismo como uma quebra na estrutura do *DNA*. Tornam-se menores em células em proliferação, até que sejam disfuncionais, resultando em instabilidade genômica ou repressão irreversível do ciclo celular. A manutenção dos telômeros é um dos marcos de células cancerosas, acreditando-se que eles permitam a proliferação contínua dessas células (Hanahan and Weinberg 2000). Houve correlação da telomerase com outros marcadores de proliferação celular como MIB-1, índice mitótico e índice de proliferação em ependimomas (Tabori, Wong et al. 2008) e também foi um fator prognóstico independente para sobrevida (Mendrzyk, Korshunov et al.

2006; Tabori, Ma et al. 2006; Tabori, Wong et al. 2008; Modena, Buttarelli et al. 2012) e tempo livre de progressão (Tabori, Wong et al. 2008).

Rogers e cols. (2013) estudaram ativação da via *PI3K/AKT* por meio de IHQ, *RT-qPCR*, cultura de células e *Western Blot* (WB). A casuística era de casos pediátricos e de localização intracraniana na sua maioria. Havia casos de histologia clássica e anaplásica. A expressão da proteína *AKT* foi identificada em 72% casos e se mostrou um marcador de menor tempo para recorrência de forma independente. Houve correlação da expressão de *AKT* e de ciclina D1 (usado como marcador de proliferação celular), ambos mais expressos nos casos supratentoriais. No estudo experimental com inibidor da via *PI3K* em cultura de células de ependimoma (ambos os casos eram supratentoriais), foi evidenciada diminuição da proliferação celular. A expressão proteica de P-S6 (marcador de *mTOR*) e *PTEN* não tiveram correlação com *AKT* e com a evolução clínica.

Outro constituinte dessa via, NF- κ B, também foi analisado por Parker e cols. (2014). Nesse estudo, foi observado que dois terços dos tumores supratentoriais apresentaram fusão entre *RELA*, um efector conhecido da via de sinalização de NF- κ B, e um gene não conhecido, *C11orf95*. A proteína formada dessa fusão se transloca espontaneamente ao núcleo e ativa os genes-alvo de NF- κ B, como a ciclina D1, resultando em transformação das NSC em tumores.

Epigenética é definida como as modificações no genoma que são herdadas durante a divisão celular e que não estão relacionadas à mudança na sequência do DNA. O envolvimento de alterações epigenéticas, como hipermetilação e acetilação, também tem sido analisado no processo de tumorigênese dos ependimomas, especialmente naqueles tumores com perfil “balanceado” por CGH, embora os resultados necessitem uma validação em outras casuísticas (Mack and Taylor 2009; Milde, Kleber et al. 2011; Yao, Mack et al. 2011; Mack, Witt et al. 2014). Exemplos de genes já estudados são: *HIC1*, *RASSF1A*, *CASP8*, *TFRSF10C/D*, *TNFRSF10C*, *CDKN2A*, *DAPK*, *THBS1*, *TIMP3*, *TP73*, *MGMT*, *GSTP1*, *FHIT*, *RARB*, *BLU*, *MCJ*, *MAPK10*, *PPARG* (Rousseau, Ruchoux et al. 2003; Alonso, Bello et al. 2004; Waha, Koch et al. 2004; Hamilton, Lusher et al. 2005; Michalowski, de Fraipont et al. 2006; Rogers, Kilday et al. 2012). Em estudo recente, os ependimomas de pior

prognóstico (os de fossa posterior do grupo A de Witt e cols., 2011) apresentavam um fenótipo com ilhas de CG metilado (referidos como *CIMP – CpG island methylator phenotype*) cujo silenciamento transcricional convergia para alvos do complexo repressivo 2 *Polycomb (PRC2)*. Os autores propuseram que esses tumores seriam responsivos a medicações que têm como alvo o DNA ou H3K27 metilado, como os inibidores de histona deacetilase (*HDACi*) (Mack, Witt et al. 2014).

MicroRNA (miRNA) são pequenos RNAs não codificadores que agem bloqueando a tradução de RNA mensageiro, desempenhando um importante papel na regulação da expressão de genes. Estão associados a uma variedade de processos biológicos, incluindo diferenciação, proliferação e apoptose, além de diversas doenças, incluindo diferentes tipos de câncer (Ambros 2004). Um estudo recente da expressão de *miRNA* em ependimomas mostrou conjuntos específicos de *miRNA* hiperexpressos relacionados à recidiva e à sobrevida, e como fatores prognóstico independentes (Costa, Bischof et al. 2011).

Uma das questões-chave a ser respondida no campo da pesquisa do câncer é determinar o tipo celular normal que origina um tumor em particular. Isso é um passo crucial para a identificação dos eventos oncogênicos sucessivos que levam ao início e à progressão do tumor, sendo, assim, indispensável para o desenvolvimento de terapias-alvo específicas (Yao, Mack et al. 2011). Os ependimomas de diferentes regiões no SNC mostram-se geneticamente distintos com assinaturas de expressão gênica únicas, indicando desregulação de vias de desenvolvimento diferentes envolvidas na tumorigênese (Korshunov, Neben et al. 2003; Taylor, Poppleton et al. 2005; Modena, Lualdi et al. 2006; Palm, Figarella-Branger et al. 2009; Johnson, Wright et al. 2010; Rousseau, Idhahbi et al. 2010; Witt, Mack et al. 2011; Yao, Mack et al. 2011; Godfraind, Kaczmarek et al. 2012; Wani, Armstrong et al. 2012; Kim, Huang et al. 2013).

Taylor e cols. (2005) propuseram que as *RGC*, provavelmente, dão origem aos ependimomas. Essas células são um grupo específico de *NSC* representando uma população heterogênea de células precursoras neurais multipotentes que geram neurônio e glia, e guiam as células durante a migração neuronal. São elementos-chave na divisão e diferenciação de cada

região específica no SNC com diferenças significativas na expressão gênica e função dentro dessas regiões (Campbell and Gotz 2002). As células neuroepiteliais são os progenitores mais precoces do SNC e expressam *CD133*, *nestin* e *RC2*, sendo, também, as precursoras da *RGC*. As *RGC* expressam, também, *GLAST* e *BLBP*, além de *CD133*, *nestin* e *RC2* das células neuroepiteliais. Após o início da neurogênese, as *RGC* dão origem a neurônios pós-mitóticos, astrócitos e células endoteliais, cada uma com marcadores de expressão específicos, embora essas células deixem de expressar *CD133* e *nestin*. Os marcadores de neurônio são tubulina beta 3 e *MAP2*, de astrócitos *GFAP* e *S100*, de oligodendrócitos *CNPase* e *NG2* (Shitamukai and Matsuzaki 2012). Células semelhantes às células gliais radiais (*RG-like cells*) persistem na ZSV e intramedular mesmo após o desenvolvimento (Merkle, Tramontin et al. 2004). Células-tronco cancerosas são similares às células-tronco normais do tecido de origem correspondente, mas com padrões de disfunção de diferenciação, sobrevivência e autorrenovação (Clarke and Fuller 2006; Poppleton and Gilbertson 2007).

Nesse estudo de Taylor (2005), culturas de quatro ependimomas intracranianos e um intramedular foram analisadas para identificar a formação de neuroesferas. As neuroesferas são estruturas esferoides que expressam integrina beta 1, *EGFR* e caderinas, produzem suas próprias moléculas de matriz extracelular (MEC) e fatores de crescimento, e iniciam o contato célula-célula, mantendo-se, por divisão celular, em suspensão nas culturas. As neuroesferas seriam como as células-tronco neurais devido à capacidade de proliferação, autorrenovação e diferenciação nas três linhagens neuronais (neurônios, astrócitos e oligodendrócitos) (Ahmed 2009). As populações geradas nessa cultura de ependimoma apresentaram de 0,34 a 0,74% de neuroesferas, expressando *CD133+/Nestin+/RC2+/BLBP+*, com capacidade de proliferação e diferenciação, passando a expressar marcadores neuronais, astrocíticos e de oligodendrócitos. O transplante dessas neuroesferas em rato reproduziu o ependimoma inicial, mesmo que implantado em outro local. A conclusão foi que as neuroesferas geradas expressam marcadores de *RGC*, e foram necessárias e suficientes para recapitular o tumor original em modelo *in vivo*, sendo essas células, provavelmente, as células de origem dos

ependimomas. As vias *Notch* e *EphB-Ephrin* induzem transformação neoplásica da RGC na ZSV e alterações, nessas vias, foram mais encontradas em tumores supratentoriais, enquanto que alterações na expressão, em genes da família *HOX*, foram mais encontrados em tumores intramedulares (Taylor, Poppleton et al. 2005). Estudo da expressão de *nestin* por imunohistoquímica em 379 amostras de ependimoma mostrou que positividade para esse marcador foi um fator prognóstico independente do grau histológico para menor sobrevida e menor tempo livre de doença naqueles pacientes (Milde, Hielscher et al. 2012).

Diferenças de transcrição entre tumores histologicamente idênticos são ditadas não apenas pela origem da célula, mas, também, por eventos genéticos específicos que promovem a expansão clonal (Yao, Mack et al. 2011). Os ependimomas em adultos teriam um modelo de iniciação/progressão do câncer em vários passos, enquanto que, na população pediátrica, o comportamento seria como o de uma células imaturas do tecido normal similar as células-tronco cancerosas em relação à diferenciação e autorrenovação. Os genes, nesses casos, seriam considerados oncogenes ou supressores exercendo efeito oncogênico em um ambiente de desenvolvimento particular ou em uma janela temporal ou devido a alterações epigenéticas. Há evidências acumuladas de que a gênese do ependimoma é um resultado fenotípico da desregulação da neurogênese, com tumores vistos conceitualmente como o tecido neural diferenciado anormalmente (Kilday, Rahman et al. 2009). Modelos *in vivo* e *in vitro* estão em desenvolvimento e permitirão melhor entendimento desses processos e o desenvolvimento das novas terapias (Johnson, Wright et al. 2010; Atkinson, Shelat et al. 2011; Guan, Shen et al. 2011).

4 MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram incluídos nesse estudo os pacientes com diagnóstico de ependimoma operados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP) no período entre 1996 e 2011. Os dados clínicos desses pacientes foram revisados por meio de consulta de prontuários ou contato telefônico, de forma retrospectiva e prospectiva, e atualizados até outubro/2013 ou a data do último seguimento. Este projeto tem a aprovação do CAPPesq (número 1320/09 – Anexo 1). Todos os casos foram revisados pelo Prof. Sergio Rosemberg, neuropatologista da Divisão de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da instituição, para classificação do tipo e grau histológico das lesões segundo a OMS. Pacientes com diagnóstico de subependimoma e ependimoblastoma foram excluídos do estudo.

Nove pacientes foram excluídos devido a dados clínicos insuficientes e, em 121 casos, os dados disponíveis estavam adequados para o estudo. Foram coletados os dados referentes a sexo, à idade ao diagnóstico, à localização do tumor, ao grau histológico, ao grau de ressecção por meio de descrição cirúrgica, ao tratamento complementar com radioterapia ou quimioterapia, à recidiva ou ao recrescimento da lesão, ao número de cirurgias e ao óbito (Tabela 1).

A média de idade foi de 27,2 anos, variando entre 6 meses a 85,8 anos. A maioria dos pacientes era adulta (maiores que 18 anos; 66,9%). A distribuição entre casos intracranianos e intramedulares foi semelhante e a histologia clássica predominante (76%). O tempo livre de progressão foi considerado da data da cirurgia até a recorrência nos casos de ressecção completa ou até a data de recrescimento da lesão nos casos de ressecção subtotal. Considerou-se o tempo de sobrevida como da data da cirurgia até o óbito ou a data do último seguimento. A média de tempo de seguimento após cirurgia foi de 57,5 meses, variando de um mês a 18 anos. O acesso à

descrição cirúrgica não foi possível em 13 pacientes e 22 pacientes tiveram o seguimento pós-operatório menor que dois meses e não foram incluídos na análise de recidiva. Quatorze pacientes foram excluídos da análise de sobrevida devido a seguimento incompleto em relação a óbito.

A radioterapia fez parte do tratamento das lesões intracranianas com ressecções incompletas ou com alto grau histológico. Pacientes com lesões intramedulares de alto grau histológico e casos com recidivas e submetidos a uma nova ressecção cirúrgica foram também submetidos à radioterapia. A quimioterapia foi utilizada apenas em casos de recidiva e com tumor de alto grau histológico como terapia de resgate após reoperação e radioterapia. A realização de radioterapia e quimioterapia não foi confirmada em 11 e 14 pacientes, respectivamente. Essas terapias complementares foram realizadas em institutos ou em outros hospitais referenciados.

Informações sobre a forma de apresentação e o tempo entre o início dos sintomas e o tratamento também foram coletadas. Dor foi o sintoma mais comum nos tumores intramedulares (65%), de forma isolada ou em associação com déficit motor, porém déficit motor ou esfinteriano exclusivamente foi raro (11,5%). Nos pacientes com lesões intracranianas, os sintomas de hipertensão intracraniana, como cefaleia, vômitos e sonolência, foram encontrados em 73,3% dos casos, isoladamente ou em associação com déficits motores. Outros sintomas, como convulsão, paralisia de pares cranianos, ataxia ou déficits motores exclusivos, foram menos frequentes. A média do tempo entre o início dos sintomas e diagnóstico foi de 21 meses, variando de um mês a 18 anos, sendo esse tempo mais curto nas lesões intracranianas (média de cinco meses) e com um caráter mais indolente nas lesões intramedulares (média de 37 meses).

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes da casuística de ependimomas e número de amostras de tecido congelado e tecido em parafina

VARIÁVEL	PACIENTES (%)	TECIDOS CONGELADO	TECIDOS EM PARAFINA
TOTAL	121 (100%)	33	149
Sexo			
Masculino	62 (51,2%)	--	--
Feminino	59 (48,8%)	--	--
Idade			
<3 anos	11 (9,1%)	6	18
≥3 - <18 anos	29 (24,0%)	13	39
≥18 anos	81 (66,9%)	14	92
Localização			
Intramedular	61 (50,4%)	10	67
Supratentorial	26 (21,5%)	11	39
Fossa posterior	34 (28,1%)	12	43
Grau histológico			
Grau I	10 (8,3%)	1	15
Grau II	92 (76,0%)	26	100
Grau III	19 (15,7%)	6	34
Grau de ressecção			
Completo	67 (62,0%)	--	--
Subtotal	41 (38,0%)	--	--
Radioterapia			
Sim	38 (34,2%)	--	--
Não	73 (65,8%)	--	--
Quimioterapia			
Sim	19 (17,7%)	--	--
Não	88 (82,3%)	--	--
Recidiva ou recrescimento			
Sim	41 (41,4%)	20	39
Não	58 (58,6%)	8	54
Número de cirurgias			
Uma	90 (74,4%)	--	--
Duas	23 (19,0%)	--	--
Três ou mais	8 (6,6%)	--	--
Óbito			
Sim	19 (17,8%)	--	--
Não	88 (82,2%)	--	--

4.2 Amostras de tecido

Trinta e três amostras de tecido tumoral (correspondente a 32 casos, incluindo 1 recidiva) foram congelados (Tabela 1). Os fragmentos de tecido tumoral foram coletados imediatamente após a ressecção pelo Grupo de Tumores Encefálicos (pacientes com lesões intracranianas adultos), Grupo de Coluna (pacientes com lesões intramedulares adultos) e Grupo de Neurocirurgia Pediátrica (pacientes pediátricos) da Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Instituto Central, Departamento de Neurologia do HC-FMUSP. Esses fragmentos foram congelados e estocados em nitrogênio líquido no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do LIM 15, Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina da USP. Os consentimentos pós-informados foram obtidos dos pacientes ou responsáveis legais. Estes 32 casos estavam incluídos na casuística total de 121 casos.

Blocos de tecidos incluídos em parafina de seis casos não estavam disponíveis. Um total de 149 blocos de ependimoma fixados em parafina, correspondendo a 115 casos, incluindo 23 casos com 1 ou mais recidivas, foram utilizados no estudo (Tabela 1). Os blocos de parafina com ependimoma foram utilizados para a construção de *TMA*. Para cada bloco, selecionaram-se 2 pontos de 2 mm de diâmetro por meio da avaliação do neuropatologista das lâminas de HE correspondentes. As áreas com maior homogeneidade celular, sem necrose, foram selecionadas de cada caso. Os casos de tumores mixopapilares (15 casos) foram excluídos da construção do *TMA* devido à constituição hipocelular e com grande quantidade de matriz mucoide peculiar desse tipo histológico. Esses casos foram estudados com cortes completos.

4.3 Análise da expressão gênica *in silico*

A expressão gênica dos ependimomas foi analisada por meio das informações dos dados de *SAGE* dos bancos públicos. Onze bibliotecas de ependimomas e quatro de tecido não tumoral do SNC foram utilizadas na análise (Tabela 2). O grupo de Bioinformática do Instituto Ludwig de Pesquisa

sobre o Câncer de São Paulo auxiliou com a disponibilização de ferramenta de comparação do número de *tags* normalizado das bibliotecas de maneira automática e a identificação de genes diferentemente expressos nos tecidos tumorais em relação a tecidos não tumorais de forma quantitativa. Os genes das bibliotecas de ependimoma e não tumoral do SNC foram comparados por meio dessa ferramenta e os que apresentaram um valor de expressão sete vezes maior nos ependimomas foram analisados, totalizando 256 genes.

Tabela 2 - Bibliotecas de *SAGE* utilizadas para a seleção de genes diferencialmente expressos em ependimomas

NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA	DESCRIÇÃO	IDADE
Ependimoma		
137	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_1150</i>	4 anos
139	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_1394</i>	6,3 anos
140	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_239</i>	34 anos
147	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_R1023</i>	7 anos
148	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_R353</i>	27 anos
149	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_R455</i>	17 anos
150	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_R582</i>	31 anos
151	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_R628</i>	3 anos
267	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_H580</i>	29 anos
388	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_R512</i>	7 anos
406	<i>SAGE_Brain_ependymoma_B_R510</i>	1,7 anos
Tecido não tumoral SNC		
8	<i>SAGE_Brain_normal_cortex_B_BB542</i>	82 anos
10	<i>SAGE_Brain_normal_cortex_B_pool6</i>	17 anos
133	<i>SAGE_Brain_normal_peds_cortex_B_H1571</i>	1,6 anos
430	<i>SAGE_Brain_fetal_normal_B_S1</i>	20-30 semanas

Foram selecionados 30 genes dos 256 inicialmente analisados. Esses genes apresentavam representação de *tags* em todas ou na maioria das bibliotecas e já tinham sequência de referência (*RefSeq gene*) no banco do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Os dados de função, localização cromossômica e participação em vias de sinalização importantes para tumorigênese desses 30 genes foram revisados, chegando-se a uma seleção final de 10 genes (Tabela 3) segundo seguintes critérios:

- localização em uma região cromossômica descrita como amplificada em ependimomas por meio de estudos de *CGH* ou *aCGH*; e/ou

- participação em vias ou função importante para o processo tumoral descritos em ependimomas por meio de estudos de *microarray*, como via Notch, genes da família *homeobox*, genes envolvidos com proliferação celular, como as ciclinas; e/ou
- genes ainda não descritos como hiperexpressos em ependimomas, porém com funções envolvidas em processos tumorais, como proliferação, motilidade, adesão ou sinalização celular;
- não ser um gene que codifica uma proteína constitutiva (exemplo: *GFAP*).

4.4 Validação dos resultados de SAGE

Os dez genes selecionados pelos dados de SAGE e revisão de literatura foram validados pela análise de expressão por *PCR* quantitativo em tempo real (*RT-qPCR*) nas amostras de tecido congelado. A análise do *RT-qPCR* se baseia no C_T (*cycle threshold* – limiar do ciclo), que é definido como número de ciclos necessários para o sinal da fluorescência de determinado corante utilizado na reação cruzar um limiar definido. Para esse valor ser representado como limiar do ciclo (C_T), deve-se assegurar que esse limiar selecionado está em fase exponencial de amplificação da *PCR*. O valor numérico do limiar do ciclo (C_T) é inversamente relacionado à quantidade de cópias na reação (quanto menor o valor, maior a quantidade de cópias e, portanto, maior é a expressão do gene).

As sequências iniciadoras (*primers*) e condições de amplificação foram determinadas para cada gene. Utilizou-se a média geométrica de três genes de referência para normalização e controle interno dos resultados da expressão gênica (Valente, Teixeira et al. 2009). A expressão de um gene específico foi comparada entre as amostras tumorais de acordo com dados clínicos, como a localização (intracraniano vs intramedular), a idade (pediátrica vs adulto) e o grau histológico.

Tabela 3 - Genes selecionados *in silico* para análise de expressão gênica em ependimomas

GENE	REFSEQ	NOME	FUNÇÃO	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA
<i>ARMC3</i>	NM_173081.3	<i>Armadillo repeat containing 3</i>	Transdução de sinal, desenvolvimento, adesão e motilidade celular	10p12.31
<i>CCND1</i>	NM_053056.2	<i>Cyclin D1</i>	Proliferação e diferenciação celular	11q13
<i>CHST5</i>	NM_024533.4	<i>Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5</i>	Sulfatação de carboidrato	16q22.3
<i>DNALI1</i>	NM_003462.3	<i>Dynein, axonemal, light intermediate chain 1</i>	Motilidade celular	1p35.1
<i>FGFRL1</i>	NM_021923.3	<i>Fibroblast growth factor receptor-like 1</i>	Proliferação, diferenciação e motilidade celular	4p16
<i>GNA13</i>	NM_006572.4	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13</i>	Diferenciação, motilidade celular e apoptose	17q24.3
<i>IGF2</i>	NM_000612.4	<i>Insulin-like growth factor 2; somatomedin A</i>	Transdução de sinal, desenvolvimento, proliferação.	11p15.5
<i>MSX1</i>	NM_002448.3	<i>Msh homeobox 1; homeobox 7</i>	Fator de repressão de transcrição	4p16.3-p16.1
<i>NOTCH1</i>	NM_017617.3	<i>Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)</i>	Função durante o desenvolvimento neuronal com controle sobre o destino das células	9q34.3
<i>RSHL3</i>	NM_001010892.2	<i>Radial spokehead-like 3</i>	Motilidade celular	6q22.1

4.4.1 Extração de RNA

As 33 amostras de ependimoma congeladas foram analisadas em cortes de 4 µm corados com Hematoxilina e Eosina (HE) a fim de se verificar a qualidade do tecido. Porções de tecido não tumorais (tecido normal e/ou necrose) foram microdissecados previamente à extração de RNA. O RNA foi extraído por meio de RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme instruções do fabricante. A qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose denaturante e as concentrações foram determinadas por meio de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260/280 nm no aparelho *ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, Estados Unidos). Razões que variavam de 1,8 a 2,0 foram consideradas satisfatórias para grau de pureza do RNA.

4.4.2 Transcrição reversa

A transcrição reversa para síntese da primeira fita de DNA complementar (*cDNA*) foi realizada a partir de 1 µg de RNA total previamente tratado com DNase I (FPLC-pure, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. Utilizaram-se oligo (dT) e oligonucleotídeos randômicos (*random primers*), inibidor de Rnase, RNaseOUT, e a transcriptase reversa Superscrit III, seguindo as instruções do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). O *cDNA* resultante foi tratado com RNase H (GE Healthcare) para degradação das fitas simples de RNA, diluído com tampão de Tris-EDTA (TE) e estocado a -20 °C até a utilização.

4.4.3 PCR quantitativo em tempo real (*RT-qPCR*)

Os genes de referência selecionados foram: *GUSB* (*glucuronidase beta*), *HPRT* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*) e *TBP* (*TATA box binding protein*). As sequências iniciadoras (*primers*) dos dez genes selecionados para estudo e dos três genes constitutivos (Tabela 4) foram desenhadas segundo os critérios:

- sequência *forward* e *reverse* em exons diferentes para evitar ampliações de possível DNA contaminante;

- temperatura de anelamento semelhante (cerca 60 °C);
- produtos de PCR de tamanho entre 80 e 130 pares de base;
- concentração de G/C entre 40 e 60%;
- a presença de, no máximo, dois nucleotídeos C e/ou G nos últimos cinco nucleotídeos da extremidade 3';
- ausência de *hairpins*, homo e heterodímeros.

Todas as sequências iniciadoras foram sintetizadas pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, Estados Unidos).

Tabela 4 - Sequências de nucleotídeos dos *primers* (5'-3') e tamanho dos produtos de PCR (pares de base - pb) para análise de *RT-qPCR*

GENES	F: <i>FORWARD</i> R: <i>REVERSE</i>	TAMANHO DOS PRODUTOS (PB)
<i>ARMC3</i>	F: CCTTGAACCTGGAGCTGTGGA R: CATTATTAGAAGCCAGGATTCCAAA	107
<i>CCDN1</i>	F: GGCGGAGGAGAACAAACAGA R: GGGCGGATTGGAAATGAACT	91
<i>CHST5</i>	F: TCTGTGTGGCATAGAGTGATTCAA R: CACCGTCCAGGGCTGCT	129
<i>DNAL1</i>	F: CCAAGGCTCGGCTACTGAAA R: AGGATCTGGGACACAGGGAGT	107
<i>FGFRL1</i>	F: ACATTAGCCCAGGGAAGGAGA R: CATCTTGAGGGCTGTGTGAA	157
<i>GNA13</i>	F: GCCCCACCATCTACAGCAA R: CGGGTATCAAACGACATCATCTT	130
<i>IGF2</i>	F: GCCCTCCTGGAGACGTACTGT R: ACGGGGTATCTGGGGAAGTT	98
<i>MSX1</i>	F: CGAGAGGACCCCGTGGAT R: CGGCTTACGGTTCGTCTTGT	106
<i>NOTCH1</i>	F: GAATGGCGGGAAGTGTGAA R: GGTTGGGGTCCTGGCAT	88
<i>RSPH3</i>	F: TCAGGGTCGCTGTAATTGGTT R: GTCAAAAGAGGAAGCCCCACT	119
<i>GUSB</i>	F: GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA	101
<i>HPRT</i>	F: TGAGGATTTGAAAAGGGTGT R: GAGACACAGAGGGCTACAA	118
<i>TBP</i>	F: AGGATAAGAGAGCCACGAACCA R: CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT	98

As reações de *RT-qPCR* foram realizadas utilizando-se método de incorporação de *Sybr Green* em aparelho ABI 7500 (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos): um volume final de 12 μL contendo 6 μL de *Power Sybr Green I Master Mix* (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 3 μL de *cDNA* e 3 μL de *primers* (*forward* e *reverse*). As condições de amplificação foram: incubação a 50 °C por 5 min, desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por 60 s (anelamento dos *primers* e extensão). Todas as reações foram realizadas em duplicata e repetidas quando o desvio-padrão das duas reações ficou acima de 0,4. A média aritmética foi calculada para todas as duplicatas.

As otimizações das reações foram realizadas para determinar as concentrações finais mínimas de *primers*. Concentrações de 200 nM, 400 nM e 600 nM foram testadas. A escolhida foi a menor concentração de *primers* que não interferisse na amplificação (Tabela 5). A amplificação de produtos únicos foi confirmada com a análise das curvas de dissociação dos produtos amplificados. O tamanho correto dos produtos de *RT-qPCR* para cada gene foi confirmado por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

As eficiências de amplificação (E) foram calculadas a partir dos dados de diluições seriadas de *cDNA* utilizando-se a fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ (Figura 1 e 2).

Tabela 5 - Dados das curvas de eficiência das reações de *RT-qPCR* de acordo com os genes estudados

GENE	[] PRIMERS (nM)	EFICIÊNCIA (%)
<i>ARMC3</i>	200	101
<i>CCND1</i>	200	98
<i>CHST5</i>	200	98
<i>DNALI1</i>	200	94
<i>FGFRL1</i>	200	87
<i>GNA13</i>	200	103
<i>IGF2</i>	200	103
<i>MSX1</i>	400	93
<i>NOTCH1</i>	200	91
<i>RSHL3</i>	200	109
<i>GUSB</i>	400	98
<i>HPRT</i>	200	100
<i>TBP</i>	200	100

Figura 1 - Curvas de amplificação da reação de *RT-qPCR* do gene *DNALI1* para determinação da eficiência

Figura 2 - Análise de eficiência da reação de *RT-qPCR* do gene *DNALI1* de acordo com as concentrações de *RNA* testadas. Valores de *slope* e *R* para o cálculo da eficiência de acordo com a fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$

Para a análise da expressão gênica, o valor $2^{-\Delta CT}$ foi calculado, onde $\Delta CT = C_T$ dos genes-alvo – média geométrica dos três genes de referência, quando a eficiência ficou em $100 \pm 10\%$ (Schmittgen and Livak 2008). No caso do gene *FGFRL1*, cuja eficiência foi menor, o valor de 2 no cálculo foi substituído por 1,87 (Pfaffl 2001).

4.4.4 Expressão proteica de ciclina D1

A imunolocalização da proteína ciclina D1 foi realizada em cortes de *TMA* ou cortes de tumor (mixopapilares) de 4 μ m de espessura por método colorimétrico (imuno-histoquímica – IHQ). As reações foram realizadas com sistema de detecção de anticorpos *Envision FLEX* (DAKO) seguindo as recomendações do fabricante (Dako, Carpentia, CA, Estados Unidos). As lâminas foram imersas em tampão citrato (pH 6,0) e desparafinadas a 65 °C por 20 min, seguindo recuperação antigênica a 97 °C por 20 min no equipamento *PTLink* (Dako). Procedeu-se o bloqueio de peroxidase endógena por 5 min em solução *Envision Flex peroxidase block* e, em seguida, incubação com anticorpo *FLEX monoclonal rabbit anti-cyclin D1*, clone *EP12* (1:2 *Dako ready to use*) por 16 horas à temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com polímero *EnVision Flex/HRP* por 20 min e o complexo antígeno-anticorpo formado foi detectado com cromógeno *EnVision Flex Substrate Working Solution – DAB* por 10 min. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Meyer, desidratadas com três banhos de xilol e montadas com meio permanente (DAKO CS703).

As lâminas coradas foram digitalizadas em escaner da *3DHISTECH* (Budapest, Hungria) e analisadas por dois observadores independentes, sem acesso a informações clínicas de cada caso, por meio do programa *Pannoramic Viewer* (*3DHISTECH*). Os dados foram comparados, e aqueles discordantes foram reavaliados em conjunto até se chegar a um consenso final, e, quando necessário, utilizando os cortes originais de *TMA* em microscópio de luz (Nikon). A análise se baseou em sistema de gradação semiquantitativo que considerava tanto a intensidade quanto a porcentagem de células marcadas. Considerou-se para intensidade de marcação: 0= negativo,

1= fraco, 2= moderado, 3= forte; e para a porcentagem de células marcadas: 1= 1-25%, 2= 26-50%, 3= 51-75%, 4=76-100%. O índice de marcação (*labeling index - LI*) foi obtido pelo produto da intensidade de marcação pela porcentagem de células marcadas. O valor final para cada caso corresponde ao valor mais alto entre as duplicatas do *TMA*. Campos representativos de alguns casos foram fotografados e processados de forma digital pelo mesmo programa *Pannoramic Viewer*.

4.5 Análises estatísticas

A associação entre variáveis clínicas e histológicas foi testada pelo Teste de Fisher (duas variáveis dicotômicas) ou Teste de Pearson Chi-quadrado (mais que duas variáveis). Os valores de expressão gênica de acordo com as variáveis clínicas foram avaliados com o teste Kolmogorov-Smirnov, com a maioria dos genes não apresentando distribuição normal. Os testes não paramétricos de Mann-Whitney (para duas variáveis) e Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn (mais que duas variáveis) foram usados para avaliação de diferença dos níveis de expressão gênica entre os grupos de acordo com as variáveis clínicas. A correlação entre a expressão dos genes entre si e entre a expressão gênica e a proteica da ciclina D1 foi analisada pelo teste de Spearman. Os desfechos da doença medidos por recidiva e óbito foram analisados em termos de tempo livre de progressão e tempo de sobrevida total, respectivamente, de acordo com as curvas de Kaplan-Meier e as variáveis clínicas, e a diferença entre elas analisada pelo teste log rank (Mantel Cox). Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significante quando $p < 0,05$. Os cálculos foram realizados em programa de estatística SPSS versão 15.0 (IBM, Armonk, Estados Unidos) e os gráficos foram realizados tanto no SPSS quanto no programa GraphPad Prism versão 4 (San Diego, CA, Estados Unidos).

5 RESULTADOS

5.1 Análise dos dados clínicos

Não houve correlação do sexo dos pacientes com outros dados clínicos. A idade apresentou distribuição não normal com picos de incidência antes dos 10 anos e por volta dos 30 anos (Figura 3A). As variáveis clínicas de idade, localização e grau histológico foram analisadas entre si (Figura 3B/C/D).

Figura 3 - (A) histograma de distribuição da idade dos pacientes ao diagnóstico; gráficos de barras com a distribuição da idade de acordo com a (B) localização do tumor e (C) grau histológico; (D) distribuição do grau histológico de acordo com a localização. IM, intramedular; ST, supratentorial; FP, fossa posterior (infratentorial); GI, mixopapilar; GII, histologia clássica, GIII, histologia anaplásica

Os tumores intramedulares foram predominantes e quase exclusivos da idade adulta. Por outro lado, os tumores intracranianos, tanto supratentoriais como infratentoriais, foram mais frequentes em crianças (Figura 3B).

Os tumores mixopapilares (grau I) ocorreram apenas na localização intramedular e em pacientes maiores que 18 anos. O número de casos com tumores de histologia anaplásica (grau III) foi semelhante em pacientes maiores e menores de 18 anos, enquanto que a histologia clássica foi mais frequente nos adultos (Figura 3C), nos casos intramedulares e infratentoriais (Figura 3D). A frequência de casos clássicos e anaplásicos foram semelhantes nos supratentoriais (Figura 3D).

Não houve correlação entre o grau de ressecção e a idade ($p=0,29$), ou com a localização do tumor ($p=0,148$) ou com o grau histológico ($p=0,48$). Recidiva ocorreu em 41 casos (41,4%) e a média de tempo livre de progressão da doença foi de 108,8 meses, sendo que 63,4% das recidivas ocorreram em até dois anos e apenas em dois casos, um supratentorial e um mixopapilar, após cinco anos de seguimento (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise do tempo livre de progressão e de sobrevida de acordo com variáveis clínicas

	TEMPO LIVRE DE PROGRESSÃO ($\pm$ DP) (MESES)	<i>P</i> *	TEMPO DE SOBREVIDA ($\pm$ DP) (MESES)	<i>P</i> *
Média	108,8 ($\pm$ 9,1)		169,9 ($\pm$ 10,3)	
Idade				
<18 anos	48,9 ($\pm$ 11,5)	<0,0001	142,3 ($\pm$ 20,4)	0,362
>18 anos	142,0 ($\pm$ 9,8)		157,5 ($\pm$ 7,9)	
Localização do tumor				
Intramedular	146,3 ($\pm$ 11,2)		197,0 ($\pm$ 10,5)	
Supratentorial	55,8 ($\pm$ 14,6)	<0,0001	127,3 ($\pm$ 20,8)	0,009
Infratentorial	78,6 ($\pm$ 14,1)		111,3 ($\pm$ 13,9)	
Grau histológico				
GI	130,9 ($\pm$ 24,8)			
GII	117,3 ($\pm$ 10,3)	0,011	174,8 ($\pm$ 10,8)	0,097
GIII	34,9 ($\pm$ 8,1)		83,6 ($\pm$ 13,1)	
Grau de ressecção				
Total	132,0 ($\pm$ 11,1)	0,004	190,4 ($\pm$ 10,9)	0,008
Subtotal	72,4 ($\pm$ 14,7)		116,0 ($\pm$ 15,6)	
Recidiva				
Sim	---		142,5 ($\pm$ 18,8)	0,0002
Não	---		183,9 ($\pm$ 3,1)	

Em negrito, os valores de p e os grupos com diferenças estatísticas; desvio-padrão (DP) entre parêntesis.

A análise do tempo livre de progressão da doença, de acordo com teste log rank, mostrou menor tempo para recidiva em crianças (Figura 4A), tumores de localização intracraniana, supratentorial (Figura 4B), casos de histologia anaplásica (Figura 4C) e com ressecção subtotal (Figura 4D) (Tabela 6). Óbito foi documentado em 19 casos. A média de tempo de sobrevida, de acordo com curva de Kaplan Meier, foi de 169,9 meses. As mortes foram correlacionadas aos tumores de localização intracraniana, tanto supratentoriais como infratentoriais (Figura 5A/B), às ressecções subtotais (Figura 5C) e às recidivas (Figura 5D) segundo teste log rank (Tabela 6).

Figura 4 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando o tempo livre de progressão acordo com (A) a idade, (B) a localização, (C) o grau histológico e (D) o grau de ressecção cirúrgica. Valores de p de acordo com teste log rank

Figura 5 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando o tempo de sobrevida de acordo com (A/B) a localização, (C) o grau de ressecção cirúrgica e (D) a recidiva. Valores de p de acordo com teste log rank

A realização da radioterapia e da quimioterapia seguiu os protocolos do HC-FMUSP vigentes na época. A radioterapia não foi utilizada em 47 de 55 (85,5%) pacientes com tumores intramedulares, em 68 de 93 (73,1%) pacientes com lesões de baixo grau histológico (grau I ou II) e em 58 de 74 (78,4%) pacientes em idade adulta. Três pacientes com tumores intramedulares fizeram quimioterapia após quadro de recidiva e reoperação. Cinco pacientes com tumores intracranianos, menores de quatro anos, também foram submetidos ao tratamento com quimioterapia.

5.2 Análise dos dados moleculares

As expressões dos transcritos dos dez genes selecionados foram analisadas na casuística de 33 amostras de ependimomas com tecidos congelados por reações de *RT-qPCR*. As variações das expressões foram correlacionadas entre si de acordo com teste de Spearman (valores de r ; Tabela 7). Houve uma correlação positiva entre a expressão de *CCND1*, *FGFRL1*, *IGF2* e *NOTCH1*, além da coexpressão entre *ARMC3*, *CHST5*, *DNALI1*, *MSX1* e *RSHL3*. Além disso, a expressão de *CCND1* se correlacionou negativamente com a expressão de *ARMC3*, *DNALI1* e *GNA13*, assim como a expressão de *FGFRL1* com a de *ARMC3*.

Tabela 7 - Correlação de Spearman (valores de r) entre os níveis de expressão dos genes selecionados

	<i>GNA13</i>	<i>CHST5</i>	<i>RSHL3</i>	<i>ARMC3</i>	<i>DNALI1</i>	<i>MSX1</i>	<i>CCND1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>FGFRL1</i>
<i>IGF2</i>	-0,27	-0,26	-0,25	-0,27	-0,23	-0,09	0,51**	0,38*	0,58***
<i>FGFRL1</i>	-0,18	-0,41	-0,25	-0,37*	-0,27	-0,15	0,55***	0,51**	1
<i>NOTCH1</i>	0,04	-0,13	0,05	-0,08	0,00	0,29	0,50**	1	
<i>CCND1</i>	-0,47**	-0,23	-0,24	-0,39*	-0,35*	-0,31	1		
<i>MSX1</i>	0,16	0,50**	0,47**	0,56***	0,61***	1			
<i>DNALI1</i>	0,14	0,78***	0,80***	0,93***	1				
<i>ARMC3</i>	0,21	0,78***	0,75***	1					
<i>RSHL3</i>	0,17	0,63***	1						
<i>CHST5</i>	0,00	1							
<i>GNA13</i>	1								

Valores com p significativo estão em negrito (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Os níveis de expressão desses genes também foram analisados de acordo com características demográficas e clínicas dos pacientes. A análise foi comparativa de acordo com a distribuição em relação ao sexo (masculino vs feminino), à idade (pacientes menores vs maiores que 18 anos), à localização (intramedular vs intracraniano, tanto supratentoriais como infratentoriais), ao grau histológico (GII vs GIII) e à recidiva (Tabela 8). Havia um paciente adulto, com tumor mixopapilar (grau I) de localização intramedular, que foi excluído apenas durante a análise quanto ao grau histológico.

Tabela 8 - Análise da distribuição da expressão gênica em relação a variáveis clínicas

	SEXO	IDADE	IM vs IC	IM vs ST vs FP	GII vs GIII	RECIDIVA
<i>ARMC3</i>	0,484	0,054	0,010	0,002	0,161	0,961
<i>CCND1</i>	0,632	0,202	0,060	0,008	0,001	0,107
<i>CHST5</i>	0,397	0,049	0,021	0,016	0,176	0,696
<i>DNALI1</i>	0,796	0,087	0,050	0,006	0,091	0,283
<i>FGFRL1</i>	0,224	0,610	0,183	0,018	0,016	0,845
<i>GNA13</i>	0,531	0,202	0,055	0,146	0,530	0,329
<i>IGF2</i>	0,507	0,041	0,008	0,011	0,002	0,205
<i>MSX1</i>	0,302	0,190	0,814	0,146	0,091	0,205
<i>NOTCH1</i>	0,238	0,711	0,256	0,011	0,053	0,696
<i>RSHL3</i>	0,556	0,094	0,010	0,016	0,267	0,242

Valores de *p* significativos (<0,05) em negrito de acordo com testes não paramétricos (Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis). IM, intramedular; IC, intracraniano; ST, supratentorial; FP, fossa posterior (infratentorial); GII, histologia clássica; GIII, histologia anaplásica

A expressão desses genes foi semelhante entre ambos os sexos. O gene *CHST5* mostrou maiores níveis de expressão em pacientes adultos, enquanto *IGF2* apresentou maior expressão nos casos pediátricos (Tabela 8; Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *CHST5* e (B) *IGF2* de acordo com a idade. Média representada por traço dentro da caixa e valores de *p* de acordo com teste Mann-Whitney

Figura 7 - Mapa de cores da expressão dos genes *CHST5* e *IGF2* de acordo com a idade do paciente na data da cirurgia. Matriz de cores com os valores mais altos representados em vermelho, mais baixos em verde e intermediários (mediana) em preto. Os menores de três anos de idade estão à direita do traço branco divisório no grupo da população pediátrica

Os genes *ARMC3*, *CHST5*, *DNALI1* e *RSHL3* apresentaram diferença de expressão de acordo com a localização, com maiores níveis nos casos de localização intramedular e menores nos intracranianos (Tabela 8; Figuras 8 e 11). Nesses genes, não houve diferença quando os casos intramedulares e infratentoriais foram comparados após teste de Dunn (Figura 9).

Figura 8 - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *ARMC3*, (B) *CHST5*, (C) *DNALI1*, (D) *IGF2* e (E) *RSHL3* de acordo com a localização. Média representada por traço dentro da caixa e valores de p de acordo com teste Mann-Whitney

Figura 9 - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *ARMC3*, (B) *CHST5*, (C) *DNALI1* e (D) *RSHL3* de acordo com a localização. Média representada por traço dentro da caixa e valores de p de acordo com teste Kruskal-Wallis

IGF2 apresentou maiores níveis de expressão nas lesões intracranianas, supratentoriais, em relação aos casos intramedulares (Tabela 8; Figuras 8, 10 e 11). Os casos supratentoriais também apresentaram maiores níveis de expressão *CCND1*, *FGFRL1* e *NOTCH1* tanto em relação aos casos intramedulares como aos casos infratentoriais, após teste de Dunn (Tabela 8; Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *CCND1*, (B) *FGFR1*, (C) *IGF2* e (D) *NOTCH1* de acordo com a localização. Média representada por traço dentro da caixa e valores de p de acordo com teste Kruskal-Wallis

Figura 11 - Mapa de cores da expressão dos genes de acordo com a localização da lesão. Matriz de cores com os valores mais altos representados em vermelho, mais baixos em verde e intermediários (mediana) em preto

A ***CCND1*** ($p=0,001$)

Figura 12 - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *CCND1*, (B) *FGFRL1*, (C) *IGF2* de acordo com o grau histológico. Média representada por traço dentro da caixa e valores de *p* de acordo com teste Mann-Whitney. O valor do caso mixopapilar é representado, porém não considerado para análise estatística

Figura 13 - Mapa de cores da expressão dos genes de acordo com o grau histológico. Matriz de cores com os valores mais altos representados em vermelho, mais baixos em verde e intermediários (mediana) em preto

O gene *GNA13* apresentou tendência a maiores níveis de expressão em crianças menores de três anos (Kruskall-Wallis $p=0,048$; teste Dunn $p=0,03$ comparando crianças maiores e menores que três anos) (Figura 14A). Os níveis de expressão de *MSX1* não se correlacionaram a nenhuma variável analisada, embora tenha apresentado coexpressão com outros genes relacionados à localização intramedular (Figura 14B).

Figura 14 - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão dos genes (A) *GNA13* de acordo com a idade e (B) *MSX1* de acordo com a localização. Média representada por traço dentro da caixa e valores de p de acordo com teste Mann-Whitney

Nenhum dos genes selecionados apresentou níveis de expressão diferenciada em relação aos casos infratentoriais. Nessa localização, *CHST5*, *IGF2* e *RSHL3* apresentaram níveis de expressão intermediários em relação aos valores dos casos intramedulares e supratentoriais, enquanto que, nos genes *ARMC3*, *CCND1*, *DNALI1*, *FGFRL1* e *NOTCH1*, os níveis foram semelhantes aos intramedulares e diferentes dos supratentoriais. Nenhum gene estudado se correlacionou com a recidiva e tempo livre de progressão ou com óbito e sobrevida.

5.3 Análise dos dados de expressão proteica

As 149 amostras de ependimoma fixadas em parafina foram utilizadas para construção de TMA e posterior análise por imuno-histoquímica. A expressão de proteína codificada pelo gene *CCND1*, ciclina D1, foi analisada semiquantitativamente quanto à intensidade de marcação nuclear e a porcentagem de células marcadas por anticorpo contra ciclina D1. Foi utilizado um índice de marcação (*LI*). Esse índice foi negativo em 12,9% casos (*LI*= 0), focal em 17% (*LI*=1), fraco em 23,1% (*LI*= 2 ou 3), moderado em 19,8% (*LI*= 4 ou 6) e forte em 27,2% (*LI*= 9 ou 12). A marcação pela ciclina D1 foi ausente nos casos de tumores mixopapilares (GI) e apenas os supratentoriais apresentaram *LI* de 12.

Os níveis de expressão gênica e os de proteína foram correlacionados nos 33 casos com amostras congeladas. Houve correlação entre o índice de marcação e os níveis de expressão gênica da ciclina D1, segundo teste de Spearman (Figura 15).

Figura 15 - Diagrama de caixa com a distribuição da expressão de ciclina D1 de acordo com o índice de marcação (*LI*) proteica. Teste de correlação de Spearman. Negativa, *LI*= 0; focal, *LI*=1; fraco, *LI*= 2 ou 3; moderado, *LI*= 4 ou 6 e forte, *LI*= 9 ou 12

Casos representativos de marcação por ciclina D1 estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Casos representativos de ependimoma com imuno-histoquímica para ciclina D1. (A) intramedular, GII ($LI=2$); (B) intramedular, GIII ($LI=9$); (C) supratentorial, GII ($LI=9$); (D) supratentorial, GIII ($LI=12$); (E) infratentorial, GII ($LI=2$); (F) infratentorial GIII ($LI=4$). Aumento de 400x

Houve maior expressão proteica de ciclina D1 nos casos intracranianos em relação aos intramedulares (Figura 17A). Semelhantemente aos dados de expressão gênica de *CCND1*, a expressão a nível de proteína ciclina D1 confirmou maiores níveis de expressão nos anaplásicos em relação aos tumores graus I e II (Figura 18A). Adicionalmente, ciclina D1 apresentou maiores níveis de expressão nos casos pediátricos em relação aos adultos (Figura 19A), dado não identificado pela expressão gênica.

Os maiores níveis de expressão de ciclina D1 nos casos intracranianos deveram-se a uma maior expressão nos casos supratentoriais (Figura 17B). A análise estratificada entre a localização, idade e grau histológico demonstrou que os maiores índices de expressão de ciclina D1 nos casos supratentoriais eram independentes da idade (Figuras 18B) ou do grau histológico (Figura 19B).

Figura 17 - Expressão proteica de ciclina D1 de acordo com índice de marcação em relação à localização (A - diagrama de caixa) intramedular vs intracraniana e (B - gráfico de dispersão) separando-se os casos intracranianos em supratentoriais e infratentoriais. IM, intramedular; IC intracraniano; ST, supratentorial; FP, fossa posterior (infratentorial)

Figura 18 - Expressão proteica de ciclina D1 de acordo com índice de marcação em relação (A - diagrama de caixa) ao grau histológico e (B - gráfico de dispersão) correlacionando-se o grau histológico com a localização. GI, mixopapilar; GII, clássico; GIII, anaplásico; IM, intramedular; IC intracraniano; ST, supratentorial; FP, fossa posterior (infratentorial)

Figura 19 - Expressão proteica de ciclina D1 de acordo com índice de marcação em relação (A - diagrama de caixa) idade e (B - gráfico de dispersão) correlacionando-se a idade com a localização. IM, intramedular; IC intracraniano; ST, supratentorial; FP, fossa posterior (infratentorial)

Recidivas foram mais frequentes nos casos com maiores índices de marcação por ciclina D1 ($L= 9$ ou 12) (Figura 20A). Estes casos apresentaram um menor tempo livre de progressão quando comparados com os casos com menores níveis de marcação ($L= 2$ a 6 ; excluindo-se casos com marcação ausente e focal) segundo análise por meio de curvas de Kaplan-Meier e teste log rank (Figura 20B).

Figura 20 - (A) Diagrama de caixa com a expressão proteica de ciclina D1 de acordo com índice de marcação em relação à recidiva. (B) Curvas de Kaplan-Meier mostrando o tempo livre de progressão de acordo com o índice de marcação da ciclina D1 (forte $L= 9$ ou 12 ; outros $L= 2$ a 6)

Não houve correlação entre o grau de ressecção e o índice de marcação de ciclina D1 (teste de Pearson $p=0,18$). Demonstrou-se, porém, que o grau de ressecção influenciou a recidiva, o tempo livre de progressão e a sobrevida total (Tabela 6). Analisou-se, então, a relação entre recidiva e o índice de marcação da ciclina D1 de acordo com o grau de ressecção cirúrgica (Figura 21A). Observou-se que, nos casos com ressecção completa, houve correlação entre maiores índices de marcação de ciclina D1 ($L=9$ ou 12) e um maior número de recidiva, com um menor tempo livre de progressão (Figura 21B). Essa correlação não foi observada nos casos de ressecção incompleta (log rank $p=0,782$).

Figura 21 - (A) Gráfico de dispersão com a expressão proteica de ciclina D1 de acordo com índice de marcação em relação à recidiva, estratificado pelo grau de ressecção cirúrgica. (B) Curvas de Kaplan-Meier mostrando o tempo livre de progressão de acordo com o índice de marcação da ciclina D1 (forte $L=9$ ou 12 ; outros $L=2$ a 6) para casos com ressecção cirúrgica completa

Óbito e o tempo de sobrevida não foram correlacionados com a marcação de ciclina D1.

6 *DISCUSSÃO*

Os ependimomas são tumores raros com um comportamento diferente de acordo com a localização, a idade ao diagnóstico e o grau histológico (Boop and Sgouros 2009; Gilbert, Ruda et al. 2010; Nagasawa, Trang et al. 2013). Por outro lado, todos esses potenciais fatores prognósticos são clínica e biologicamente inter-relacionados, contribuindo para a dificuldade em definir qual fator tem maior influência na evolução clínica desses pacientes (Amirian, Armstrong et al. 2012).

A casuística apresentou uma predominância de pacientes adultos, porém com um dos picos de incidência na primeira década de vida conforme descrito por outros autores (Reni, Gatta et al. 2007; McGuire, Sainani et al. 2009; Zacharoulis and Moreno 2009). A distribuição de casos intramedulares e intracranianos foi semelhante, mantendo a correlação entre pacientes adultos e lesões intramedulares (Schwartz and McCormick 2000; Benesch, Frappaz et al. 2012). Houve revisão anátomo-patológica de todos os casos incluídos, com maior número de casos classificados como de histologia clássica (76%), principalmente na localização intramedular e infratentorial. A proporção de casos de histologia clássica e anaplásica varia nas casuísticas da literatura. Há divergências entre patologistas quanto à interpretação dos critérios de anaplasia descritos pela OMS e à variação histológica dentro da mesma lesão (Louis, Ohgaki et al. 2007; Godfraind 2009; Ellison, Kocak et al. 2011). Nosso estudo confirmou que a idade ao diagnóstico, a localização do tumor e o grau histológico podem influenciar na recidiva, com menor tempo livre de progressão na população pediátrica, nos casos de localização intracraniana e com histologia anaplásica, conforme descrito por outros autores (Schwartz and McCormick 2000; Korshunov, Golanov et al. 2004; Tihan, Zhou et al. 2008; Gilbert, Ruda et al. 2010; Amirian, Armstrong et al. 2012; Cage, Clark et al. 2013; Raghunathan, Wani et al. 2013). Uma evolução mais favorável das lesões intramedulares e dos pacientes adultos tem sido descrita e, também, foi confirmada nesse estudo (Chang, Choe et al. 2002; Gilbert, Ruda et al. 2010; Amirian, Armstrong et al. 2012).

A cirurgia se mostrou uma intervenção terapêutica importante influenciando tanto no tempo livre de progressão como na sobrevida dos pacientes. A taxa de ressecção completa foi cerca de 60%, sem correlação com localização da lesão, idade ao diagnóstico ou grau histológico. Após a introdução da ressonância magnética para melhor planejamento pré-operatório, avanços na neuroanestesia e nas técnicas microcirúrgicas, as taxas de ressecção completa aumentaram. Os estudos atuais confirmam que o grau de ressecção completo é um fator prognóstico independente tanto para o tempo livre de progressão como para a sobrevida (Bouffet, Perilongo et al. 1998; Chang, Choe et al. 2002; Metellus, Barrie et al. 2007; Tihan, Zhou et al. 2008; Bagley, Wilson et al. 2009; Boop and Sgouros 2009; Shim, Kim et al. 2009; Amirian, Armstrong et al. 2012; Benesch, Frappaz et al. 2012; Wright and Gajjar 2012; Andreiuolo, Ferreira et al. 2013). A recidiva e a localização intracraniana também se correlacionaram com a sobrevida dos pacientes, porém são fatores interligados, assim como a recidiva e o grau de ressecção.

A busca por biomarcadores para melhor predizer a evolução clínica dos pacientes com ependimoma tem sido realizada por muitos autores (Gilbertson, Bentley et al. 2002; Korshunov, Golanov et al. 2002; Preusser, Wolfsberger et al. 2005; Mendrzyk, Korshunov et al. 2006; Ridley, Rahman et al. 2008; Tabori, Wong et al. 2008; Kuncova, Janda et al. 2009; Korshunov, Witt et al. 2010; Milde, Hielscher et al. 2012; Modena, Buttarelli et al. 2012; Moreno, Popov et al. 2013; Mack, Witt et al. 2014). Apesar dos ependimomas serem considerados como uma única doença devido às mesmas características histológicas, a maioria dos estudos mostra um perfil de expressão gênica diferente dependendo da localização do tumor e da idade do paciente ao diagnóstico (Hirose, Aldape et al. 2001; Dyer, Prebble et al. 2002; Taylor, Poppleton et al. 2005; Modena, Lualdi et al. 2006; Kilday, Rahman et al. 2009; Palm, Figarella-Branger et al. 2009; Andreiuolo, Puget et al. 2010; Johnson, Wright et al. 2010; Witt, Mack et al. 2011; Nagasawa, Trang et al. 2013). Dez genes foram selecionados para estudo da expressão gênica e para correlação dessa expressão com os dados clínicos da casuística apresentada. Identificaram-se genes diferentemente expressos, principalmente em relação à localização do tumor, mas, também, em relação à idade do paciente ao diagnóstico e ao grau histológico.

Os genes *ARMC3*, *RSHL3*, e *DNALI1* apresentaram maiores níveis de expressão nos casos de localização intramedular em relação aos intracranianos, enquanto que o gene *CHST5* apresentou maiores níveis de expressão tanto em lesões intramedulares como nos adultos. Genes que codificam as dineínas, incluindo o *DNALI1*, já foram descritos em ependimomas e apresentaram uma maior expressão nos casos de histologia clássica (Palm, Figarella-Branger et al. 2009). Não há estudos quanto à expressão dos genes *ARMC3*, *RSHL3* e *CHST5* em ependimomas. Alterações nas dineínas e na família *radial spoke head proteins (RSHP)*, incluindo *RSHL3*, têm sido descritas na discinesia ciliar primária, grupo de doenças heterogêneo no qual há alteração da ultraestrutura de cílios e flagelos (Kastury, Taylor et al. 1997; Loges, Olbrich et al. 2008; Castleman, Romio et al. 2009; Zietkiewicz, Bukowy-Bieryllo et al. 2012). As dineínas, tanto internas como externas, seriam responsáveis pela força necessária para a movimentação e batimento dos cílios, enquanto que a família *RSHP* faria a conexão dos microtúbulos periféricos com o par central e alteraria a forma do batimento dos cílios (Castleman, Romio et al. 2009; Zietkiewicz, Bukowy-Bieryllo et al. 2012). Há alguns relatos de casos na literatura de pacientes com discinesia ciliar primária em associação com hidrocefalia, sugerindo que a alteração na movimentação dos cílios do epêndima dificultaria o fluxo liquórico (Ibanez-Tallon, Gorokhova et al. 2002; Kosaki, Ikeda et al. 2004; Mirzadeh, Han et al. 2010). As células ependimárias maduras possuem numerosos microvilos apicais e um número variável de cílios, assim como seus precursores *RGC* (Lehman 2008; Mirzadeh, Han et al. 2010). Há descrição de que a ablação dos cílios primários nas *RGC*, durante o desenvolvimento embrionário, afetaria sua polaridade translacional e, em consequência, alteraria a orientação das células ependimárias maduras (Cohen, Binet et al. 1988; Fuchs and Schwark 2004; Mirzadeh, Han et al. 2010). As dineínas citoplasmáticas estariam associadas ao movimento ao longo dos microtúbulos, ao transporte dos cromossomos condensados durante a mitose (Vaisberg, Grissom et al. 1996; King 2000) e na regulação da localização nuclear do p53 (Giannakakou, Sackett et al. 2000). Há estudo utilizando *RT-PCR* e IHQ mostrando um aumento da expressão da dineína *DNCH2* em gliomas de alto grau (anaplásicos e glioblastoma

multiforme – GBM) em relação ao tecido cerebral normal e gliomas de baixo grau (Yokota, Kouno et al. 2006). Apesar dessas descrições, a função da dineína estudada, *DNALI1*, é pouco conhecida. Estudo de caracterização desse gene mostra maiores níveis de expressão detectados nos testículos, níveis médios de expressão na próstata, coração, fígado, pulmão e pâncreas, e baixos níveis de expressão nos ovários, músculo esquelético e intestino delgado; esse estudo não tem referência ao sistema nervoso central (Kastury, Taylor et al. 1997). Em outro estudo, observou-se interação entre *DNALI1* e outra dineína de cadeia pesada citoplasmática envolvida com recrutamento de proteínas centrossomais, tais como pericentrina e γ -tubulina (Young, Dictenberg et al. 2000; Rashid, Breckle et al. 2006).

O gene *ARMC3* é considerado uma *beta-catenin-like* e tem envolvimento com interação proteína-proteína, transdução de sinal, desenvolvimento, adesão e motilidade celular, iniciação tumoral e metástase (Li, Liu et al. 2006). Em estudo utilizando dados de *SAGE* para identificação de novos genes no epitélio brônquico, identificaram-se genes relacionados à ciliogênese, como as dineínas, mas, também, o gene *ARMC3* como sendo um possível regulador da ciliogênese. A expressão desses genes, tanto as dineínas como o *ARMC3*, é alta nas bibliotecas de *SAGE* de ependimomas, possivelmente devido à origem desse tumor de uma região ciliada do SNC, o epêndima. O autor sugere, ainda, que as proteínas *ARMC3* e as dineínas poderiam servir como marcadores de expansão clonal das células do ependimoma (Lonergan, Chari et al. 2006). A presença de anticorpos circulante contra a proteína *ARMC3*, também denominada KU-CT-1 ou CT18, foi descrita em pacientes com câncer de pâncreas, pulmão e endométrio, sendo considerado um antígeno *cancer-testis* (Okada, Akada et al. 2006). Há estudo sugerindo a utilização de peptídeo derivado de *ARMC3* para imunoterapia nesses cânceres, sendo esse um alvo atrativo devido à expressão mais restrita a células germinativas normais, e o potencial de produzir resposta imune tanto humoral como celular (Schiewe and Haworth 2007). No presente estudo, houve forte associação de expressão entre os genes com funções na ciliogênese, *ARMC3*, *DNALI1* e *RSHL3*, sugerindo desregulação desse processo no epêndima da região intramedular e uma possível atuação conjunta desses genes no processo de tumorigênese

dessa região. Desregulação da ciliogênese também foi descrita em subgrupo de casos de ependimomas infratentoriais com melhor evolução (grupo B de Witt e cols., 2011). Uma melhor evolução e uma maior proporção de casos de histologia clássica nos casos intramedulares também foram identificadas no presente estudo.

O gene *CHST5* pertence à família das sulfonotransferases (STr), que são enzimas responsáveis pela catalização da transferência de um grupamento sulfato de uma molécula doadora para um receptor, que pode ser um açúcar, um álcool, um fenol ou uma amina (Paul, Suwan et al. 2012). As STr citosólicas seriam enzimas metabolizantes envolvidas no clareamento de pequenos componentes endógenos e exógenos, como hormônios e medicações (Banoglu 2000; Allali-Hassani, Pan et al. 2007). Já as STr associadas à membrana fariam a sulfatação de grandes biomoléculas como carboidratos (função do *CHST5*) e proteínas, com associação a processos biológicos críticos, como reconhecimento de moléculas, adesão célula-célula, coagulação, modulação de citocinas e fatores de crescimento, e vias de sinalização bioquímica devido ao mecanismo de modificação pós-translacional gerado por esta sulfatação (Chapman, Best et al. 2004; Paul, Suwan et al. 2012). Expressão da enzima com função semelhante à expressa pelo gene *CHST5*, a N-acetilglucosamina (*GlcNAc*) 6-O-sulfonotransferases, foi identificada em muitos órgãos, sendo forte a sua expressão na medula óssea, leucócitos de sangue periférico, baço, cérebro, medula espinhal, ovário e placenta. Essa enzima é também expressa em algumas linhagens de leucemia e linfoma, em linhagem de melanoma, glioma e adenocarcinoma de cólon (Uchimura, Muramatsu et al. 1998). Há interesse na estrutura da família de STr associada à membrana (galactose/ N-acetilgalactosamina/ N-acetilglucosamina - *Gal/GalNAc/GlcNAc*) devido ao seu potencial como alvo para desenvolvimento de medicações (Rath, Verdugo et al. 2004). Houve correlação entre a expressão de *CHST5* e a dos genes correlacionados à ciliogênese, *ARMC3*, *DNALI1* e *RSHL3*, nesse estudo. A expressão do gene *CHST5* nos casos de ependimoma intramedular pode ter relação com mecanismos de regulação pós-transcricional ou com o reconhecimento de moléculas pelo epêndima mutado que ainda necessitam ser mais bem elucidados, assim como a relação desse gene com a população

adulta. O estudo da atuação de *CHST5* e *ARMC3* nos ependimomas intramedulares pode ser útil para o desenvolvimento de alvos terapêuticos, conforme descrito.

No presente estudo, o gene *MSX1* (*HOX7*) não apresentou correlação com nenhuma variável clínica. Estudos em aves mostram que os membros da família *Msx* são alvos da via de sinalização BMP e estão presentes onde essa via está ativa durante o desenvolvimento embrionário, como o romboencéfalo, a medula espinhal, o telencéfalo, dentes, arcos branquiais e membros (Liu, Helms et al. 2004; Ramos and Robert 2005; Saadi, Das et al. 2013; Vieux-Rochas, Bouhali et al. 2013). Há expressão de *Msx1* nas células da crista neural craniana em vertebrados, uma população de células pluripotentes derivada das bordas laterais da placa neural e que migram ventrolateralmente para dar origem às estruturas derivadas dos arcos branquiais (Alappat, Zhang et al. 2003; Ramos and Robert 2005; Han, Ishii et al. 2007). Vias como Notch, e membros da família TGF- β , Wnt, FGF e ácido retinoico, além de BMP, estão envolvidos com a formação e manutenção da crista neural (Ramos and Robert 2005). A expressão *Msx1* nessas células teria um papel na regulação da interação entre epitélio e mesênquima durante a organogênese (Robert, Sassoon et al. 1989; Alappat, Zhang et al. 2003). A inativação de *Msx1* em ratos mostra alteração no desenvolvimento dos dentes e do palato (Satokata and Maas 1994; Chen, Bei et al. 1996), e no desenvolvimento da região frontal da calota craniana (Alappat, Zhang et al. 2003; Han, Ishii et al. 2007). Há envolvimento de *Msx1* no desenvolvimento do tubo neural, no desenvolvimento de estruturas da linha média e do telencéfalo (Bach, Lallemand et al. 2003; Liu, Helms et al. 2004; Ramos and Robert 2005). Estudo em cultura de células com ganho de função do *MSX1* mostra que esse gene teria atuação como regulador negativo da diferenciação por meio da repressão da transcrição de genes de diferenciação, e por regular a expressão e a atividade de proteínas do ciclo celular, como ciclina D1 e CDK4 (Hu, Lee et al. 2001; Liu, Helms et al. 2004). Durante o desenvolvimento da medula espinhal do rato, *Msx1* é expresso por células da linha média da placa dorsal. Em estudo da função da família desse gene no desenvolvimento da medula espinhal e no destino dos progenitores neurais (NSC) dessa região em aves, observou-se que o aumento da

expressão de *Msx1* em fases precoces do desenvolvimento embrionários reduziu o tamanho do tubo neural, com consequente redução no tamanho da zona ventricular e na espessura da camada de manto em que estão os neurônios, tanto por reprimir a diferenciação neuronal como por aumentar a apoptose (Liu, Helms et al. 2004). Houve, também, alteração no desenvolvimento do diencéfalo em ratos mutados para não expressão de *Msx1* com interrupção da linha média dorsal na região pré-tectal, levando à hipoplasia do córtex cerebral e hidrocefalia (Bach, Lallemand et al. 2003; Ramos and Robert 2005). O *Msx1* mutado interrompe a formação e a expressão de genes do prosômero 1 (P1) da linha média, tais como *Wnt1* e *Bmp6*. A região de P1 origina o órgão subcomissural, que é uma diferenciação do epêndima dessa região em uma glândula secretora que libera, no líquido, uma glicoproteína de alto peso molecular (Rodriguez, Rodriguez et al. 1998; Fernandez-Llebrez, Grondona et al. 2004). Essa glicoproteína, em parte, permanece solúvel no líquido e, em parte, se condensa para formar uma estrutura como um fio que se estende do aqueduto, passando pelo quarto ventrículo, até o canal central da medula espinhal, conhecida como fibra de Reissner. O líquido e as glicoproteínas secretadas pelo órgão subcomissural seriam essenciais no desenvolvimento do córtex cerebral e da sua homeostase. As células ependimais têm locais específicos para a ligação com essas glicoproteínas com função ainda não determinada (Miranda, Almonacid et al. 2001). A expressão de *Msx1* também foi evidenciada nos órgãos circunventriculares nos adultos, tais como hipocampo e fímbria, podendo estar ligado à manutenção da atividade secretória e à proliferação glial (Ramos, Martinez et al. 2004), além da expressão nos neurônios dopaminérgicos (Roybon, Hjalt et al. 2008; Rossler, Boddeke et al. 2010). Há descrição de alteração da expressão de *MSX1* em ependimomas intracranianos (Korshunov, Neben et al. 2003; Suarez-Merino, Hubank et al. 2005; Modena, Lualdi et al. 2006). Por outro lado, alteração em membros da família *HOX* também foi correlacionada a tumores intramedulares (Palm, Figarella-Branger et al. 2009). No presente estudo, houve coexpressão de *MSX1* com genes expressos nos tumores intramedulares, *ARMC3*, *CHST5*, *DNALI1* e *RSHL3*. O gene *MSX1* foi descrito em tumor de Wilms, com menor expressão nos tumores em estágio 1 (não invasivos)

comparado a maior expressão naqueles em estágio 2-4 (invasivos), sugerindo associação desse gene com a capacidade de invasão desse tumor (Chetcuti, Aktas et al. 2011). Outro estudo mostra que NSC cultivadas em meio com *FGF2* e *BMP4* adquirem um fenótipo invasivo e expressam genes semelhantes aos da crista neural, incluindo *MSX1*, e genes também expressos em GBM (Sailer, Gerber et al. 2013). Sugere-se que o comportamento do gene *MSX1* pode mudar de um fenótipo repressor de transcrição e regulador do ciclo celular para outro relacionado à invasão de acordo com outros fatores regulatórios expressos pelo tumor.

Nesse estudo, a expressão do gene *GNA13* foi maior em crianças menores de três anos em relação às crianças acima de três anos, porém com níveis de expressão semelhante nos adultos. O gene *GNA13* codifica uma forma de proteína G com efeito intracelular e funções já descritas relacionadas à hemostasia (Moers, Nieswandt et al. 2003), ao desenvolvimento do endotélio durante a fase embriológica (Ruppel, Willison et al. 2005; Liu, Han et al. 2009), à ativação de Rho e à modulação do citoesqueleto e motilidade celular (Hall 1998; Hart, Jiang et al. 1998; Cappello, Attardo et al. 2006), à adesão e migração (Shan, Chen et al. 2006; Worzfeld, Wettschureck et al. 2008), à mudança de morfologia das células gliais (Honma, Saika et al. 2006), à transcrição de fatores por ativação de membro da família *Gli* ligada à via *SHH* (Douglas, Heim et al. 2011). A ativação de *GNA13* dependente de RhoA, GTPase e do fator de transcrição NF- κ B foi necessária para a manutenção da expressão de VEGFR-2 nas células endoteliais em estudo recente (Sivaraj, Takefuji et al. 2013). Esse receptor, VEGFR-2, é o principal receptor de VEGF, apresentando baixos níveis nos vasos de adultos, porém com regulação aumentada em situações que necessitem angiogênese, como cicatrização ou crescimento tumoral (Shibuya and Claesson-Welsh 2006). Há descrições recentes de envolvimento de *GNA13* com tumores de pâncreas, próstata e linfomas tipo B (Gardner, Ha et al. 2013; Morin, Mungall et al. 2013; Rasheed, Teo et al. 2013). Pode-se supor que esse gene tenha apresentado tal padrão de expressão no presente estudo devido a uma função mais relacionada à angiogênese e a um perfil mais agressivo nas crianças menores de três anos, e uma função mais relacionada ao citoesqueleto e à motilidade

celular nos adultos, em correlação com as funções dos genes *ARMC3*, *RSHL3* e *DNALI1*. A correlação negativa entre a expressão de *GNA13* e *CCND1* deve envolver vias de sinalização intracelulares ainda não elucidadas.

Os genes *CCND1*, *FGFRL1* e *NOTCH1* apresentaram maiores níveis de expressão em tumores de localização supratentorial, enquanto que *IGF2* se correlacionou com aqueles de localização intracraniana e em idade pediátrica. *CCND1*, *FGFRL1* e *IGF2* também apresentaram maiores níveis de expressão nos casos de histologia anaplásica. Esses genes já foram descritos em outras casuísticas de ependimomas com *IGF2* relacionado aos tumores de localização intracraniana (Korshunov, Neben et al. 2003; Modena, Lualdi et al. 2006), membros da família *FGFR* às lesões anaplásicas (Korshunov, Neben et al. 2003), a via *Notch* (*NOTCH1* e seus ligantes) às lesões intracranianas, supratentoriais (Taylor, Poppleton et al. 2005; Modena, Lualdi et al. 2006; Palm, Figarella-Branger et al. 2009; Johnson, Wright et al. 2010) e *CCND1* ora relacionado às lesões supratentoriais (Taylor, Poppleton et al. 2005; Rogers, Mayne et al. 2013), ora às lesões anaplásicas (Prayson 1998; Korshunov, Neben et al. 2003; Palm, Figarella-Branger et al. 2009), ora à população pediátrica (Modena, Lualdi et al. 2006).

O gene *IGF2* codifica uma proteína com função hormonal (Bergman, Halje et al. 2013). Esse gene é quase exclusivamente derivado do alelo paterno, um mecanismo de epigenética que bloqueia a expressão de um dos alelos conhecido como *imprinting* (Chao and D'Amore 2008). *IGF2* é expresso precocemente no desenvolvimento embriológico e fetal em diversos tecidos, particularmente na placenta, e mantém sua expressão nos adultos (LeRoith and Roberts 2003; Chao and D'Amore 2008; Bergman, Halje et al. 2013). Está presente na circulação e pode ser detectado no plasma. A circulação de *IGF* está associada a proteínas (*IGFBP* - *insulin growth factor binding proteins*) que apresentam expressão específica dependendo do tecido analisado e do estágio de desenvolvimento desse tecido, e com capacidade de inibir a atividade biológica dos *IGFs* (Clemmons 1997). Seu receptor, *IGF2R*, uma glicoproteína transmembrana, regula a quantidade de *IGF2* circulante e tecidual por transportar *IGF2* para dentro da célula e degradá-la, sendo, também, um *imprinted gene* expresso quase exclusivamente pelo alelo

materno (Alvino, Ong et al. 2011). *IGF2R* tem sido considerado um gene supressor de tumor, com descrição em tumores de mama, cerebrais, osteosarcomas, câncer de próstata, hepatocelular e ovário (Brown, Jones et al. 2009). Outro receptor, *IGF1R*, receptor transmembrana tirosino-quinase, apesar de ligar preferencialmente insulina e *IGF1*, também tem afinidade por *IGF2* e essa interação é associada com proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular (Belfiore, Frasca et al. 2009). *IGF1R* ativado inicia uma cascata de fosforilação com atuação em duas vias, *PI3K*, que atua na atividade metabólica, e *MAPK*, que envolve a atividade de *Ras* e regula o crescimento e diferenciação celular (Chao and D'Amore 2008; Gallagher and LeRoith 2010). Considera-se que *IGF2* pode promover crescimento tumoral de forma autócrina e parácrina uma vez que o tumor esteja estabelecido, pois não seria suficiente para induzir uma transformação maligna (Christofori, Naik et al. 1994; Toretsky and Helman 1996; Yakar, Leroith et al. 2005; Bergman, Halje et al. 2013). Um dos possíveis mecanismos para essa promoção de proliferação seria a expressão de ambos alelos, já descrito em tumores como sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms, sarcoma de células claras, carcinoma renal, gliomas malignos, tumores ginecológicos e testiculares (Feinberg, Ohlsson et al. 2006; Chao and D'Amore 2008; Bergman, Halje et al. 2013). O aumento da atividade da via *SHH* aumenta a expressão de *IGF2*, e esse aumento facilitaria a angiogênese e o potencial tumorigênico dessa via, com descrição dessa interação em meduloblastomas (Christofori, Naik et al. 1994; Rao, Pedone et al. 2004; Kim and Kim 2005; Chao and D'Amore 2008; Fernandez, Squatrito et al. 2012). O uso de inibidores de tirosino-quinase para *IGF1R* inibiu o crescimento tumoral *in vitro* e foi usado em estudo de fase II para tumores de pulmão (Yakar, Leroith et al. 2005; Carboni, Wittman et al. 2009; Karp, Paz-Ares et al. 2009; Wang, Lipari et al. 2010). A maior expressão de *IGF2* nos casos intracranianos nesse estudo pode se correlacionar com o perfil de pior prognóstico desses casos, assim como nos casos pediátricos, devido ao seu potencial de promover proliferação tumoral.

O gene *FGFRL1* é membro da família de *FGFR* pouco conhecido, com domínio intracelular sem atividade tirosino-quinases (Trueb 2011). Estudos iniciais identificaram esse gene em cartilagens, porém, por meio de *Northen*

Blot, confirmou-se altos níveis de expressão de *FGFRL1* em cartilagem do esterno e vértebras rudimentares, além de níveis moderados de expressão no coração, na língua, na aorta, no rim, no fígado e nos tendões (Trueb and Taeschler 2006). Os níveis de expressão aumentam durante o desenvolvimento embrionário em ratos (Wiedemann and Trueb 2001). Análise de *FGFRL1* em camundongo em desenvolvimento mostrou expressão em vesículas renais e estruturas nefrogênicas nascentes, semelhante à expressão de *FGFR1* sugerindo uma sinalização via este receptor (Amann and Trueb 2013). Há ligação preferencial com *FGF2*, *FGF3*, *FGF4*, *FGF8*, *FGF10* e *FGF22*, sendo que *FGF2* promove a proliferação do precursor neuronal e inibe a diferenciação via *PI3K* e inativação de *GSK3 β* , levando a acúmulo de β -catenina e potencializando a via *Notch* (Shimizu, Kagawa et al. 2008; Steinberg, Zhuang et al. 2010). Descrição inicial sugeria função na indução de adesão celular e suposto envolvimento na fusão célula-célula e formação de sincício (Trueb 2011). Há relatos de alteração desse gene em pacientes com cranioestenose (Rieckmann, Zhuang et al. 2009), com hérnia diafragmática congênita (Holder, Klaassens et al. 2007) e possível associação com a síndrome Wolf-Hirschhorn, que envolve alteração no crescimento, disgenesia facial, atraso no desenvolvimento e epilepsia com fenótipo variável, relacionada à deleção de parte do cromossomo 4p envolvendo a região de *FGFRL1* (Catela, Bilbao-Cortes et al. 2009). Há possibilidade desse gene ser expresso apenas pelo alelo materno, um *imprinted gene* (Luedi, Dietrich et al. 2007), além de ser alvo de regulação pelo *miRNA* mir-210 (Huang, Ding et al. 2009; Tsuchiya, Fujiwara et al. 2011), um dos já descritos como diferentemente expresso em ependimomas (Costa, Bischof et al. 2011). Estudo utilizando a técnica de *microarray* em busca de genes relacionados à autorrenovação das células progenitoras embrionárias demonstrou que a via de sinalização envolvendo *FGF* é uma das maiores reguladoras dessa autorrenovação e que *FGFRL1* seria um dos genes candidatos a regulador dos fatores de transcrição envolvidos nesse processo (Bendall, Stewart et al. 2007; Greber, Lehrach et al. 2007; Trueb 2011). Há descrição da interação de *FGFRL1* com membros da família *SPRED*, que agem como reguladores negativos da via de sinalização de *Ras/Raf/Erk* (Zhuang, Villiger et al. 2011); em tumores de esôfago com atuação

desse gene no ciclo celular (Tsuchiya, Fujiwara et al. 2011); em tumores de bexiga (di Martino, Taylor et al. 2013) e tumores de ovário (Schild and Trueb 2005).

A ciclina D1 é um importante regulador do ciclo celular por ter a função de fosforilar e inativar a proteína retinoblastoma (Rb), promovendo, assim, a progressão do ciclo celular da fase G1 para S (Fu, Wang et al. 2004; Wang, Wang et al. 2012). É um sensor e integrador-chave dos sinais extracelulares (Kim and Diehl 2009), sendo que sua expressão é regulada de uma maneira célula-específica por fatores de crescimento, como *EGF*, *IGF1* e *IGF2*, aminoácidos, hormônios incluindo andrógenos, ácido retinoico, ligante do receptor proliferador ativado peroxisoma gama (*PPAR γ* – *peroxisome proliferator-activated receptor gama*), fatores secretados por adipócitos e hormônios gastrointestinais (Fu, Wang et al. 2004). A expressão aumentada de ciclina D1 pode ter um papel crítico no desenvolvimento do tumor e na manutenção do seu fenótipo maligno, embora a superexpressão de ciclina D1 em si não seja suficiente a transformação neoplásica (Tashiro, Tsuchiya et al. 2007; Kim and Diehl 2009; Wang, Lisanti et al. 2011; Pestell 2013). Essa superexpressão em alguns tumores humanos é gerada por múltiplos mecanismos, englobando alterações genômicas, regulação pós-transcricional e estabilização da proteína pós-traducional (Kim and Diehl 2009). Muitos sinais oncogênicos induzem à expressão da ciclina D1 incluindo *Ras*, *Src*, *ErbB2*, β -catenina na via de sinalização *Wnt* e a via *Notch1* (Fu, Wang et al. 2004; Fleming, Hogben et al. 2008; Guo, Ye et al. 2009; Wang, Lisanti et al. 2011; Naganuma, Whelan et al. 2012). A superexpressão da ciclina D1 pode também aumentar o crescimento e a progressão do tumor por potencializar o sinal estimulatório de *bFGF* (Tashiro, Tsuchiya et al. 2007) e por alterar a resistência das células tumorais a agentes quimioterápicos, como a cisplatina, por meio de mecanismos regulatórios da apoptose (Biliran, Wang et al. 2005; Tashiro, Tsuchiya et al. 2007; Wang, Wang et al. 2012). Outro mecanismo responsável pelo aumento dos níveis de ciclina D1 em diversos tipos de cânceres é a desregulação da degradação da ciclina D1 e das ciclinas dependentes de quinase (*CDK* – *cyclin-dependent kinase*) (Alao 2007; Takahashi-Yanaga and Sasaguri 2008). Os processos envolvidos na regulação da estabilidade da ciclina D1 e agentes terapêuticos capazes de induzir a degradação da ciclina

D1 e das ciclinas dependente de quinase têm sido estudados (Freemantle, Liu et al. 2007; Fleming, Hogben et al. 2008; Shan, Zhao et al. 2009; Casimiro, Velasco-Velazquez et al. 2014). Esses agentes e os inibidores dos receptores tirosino-quinase (*RTK – receptor tyrosine kinase*) podem ser úteis no tratamento dos cânceres associados à superexpressão de ciclina D1 (Alao 2007; Fleming, Hogben et al. 2008; Takahashi-Yanaga and Sasaguri 2008; Kim and Diehl 2009; Shan, Zhao et al. 2009; Liu, Lv et al. 2011; Casimiro, Velasco-Velazquez et al. 2014).

A expressão aumentada da ciclina D1 foi descrita em vários tipos de cânceres, incluindo o linfoma de célula do manto (*MCL - mantle cell lymphoma*), o câncer de pulmão não pequenas células, o carcinoma de mama, os tumores da região da cabeça e pescoço, como os adenomas de paratireoide, os tumores de cólon e esôfago, e os gliomas de alto grau (Tashiro, Tsuchiya et al. 2007; Guo, Ye et al. 2009; Kim and Diehl 2009; Cohen, Shimizu et al. 2010; Liu, Lv et al. 2011; Naganuma, Whelan et al. 2012). Nesse estudo, houve coexpressão de *CCND1* com outros genes envolvidos em proliferação celular, como *IGF2* e receptor da família de *FGF* (*FGFRL1*), ambos sendo vias que estimulam a própria ciclina D1, conforme descrição da literatura acima. Uma maior expressão desses genes na localização supratentorial deve-se, provavelmente, à predominância de casos anaplásicos nessa região na casuística apresentada (cinco de seis pacientes), sugerindo uma desregulação de vias que estimulam a proliferação nessa localização. Esses genes, provavelmente, não são os geradores da tumorigênese nos ependimomas, porém contribuiriam para a proliferação e manutenção do fenótipo anaplásico após seu estabelecimento por outras vias. A correlação de expressão negativa desses genes envolvidos com proliferação (*CCND1* e *FGFRL1*) em relação aos genes envolvidos com ciliogênese na localização intramedular (*ARMC3* e *DNALI1*) corrobora com a evolução clínica mais lenta e melhor prognóstico evidenciado nos casos de ependimomas intramedular.

A via *Notch* influencia o destino das células durante o desenvolvimento do SNC e regula a autorrenovação das células-tronco neurais (*NSC*) tanto no tecido neural não neoplásico como nos tumores cerebrais embrionários (Gaiano and Fishell 2002; Taylor, Poppleton et al. 2005; Fan, Matsui et al.

2006; Kageyama, Ohtsuka et al. 2009; Ehm, Goritz et al. 2010; Fan, Khaki et al. 2010; Imayoshi, Sakamoto et al. 2010; Haupt, Borghese et al. 2012). O desenvolvimento neuronal envolve uma ação recíproca dinâmica entre sinais extracelulares difusos e autônomos que regulam a divisão do progenitor neuronal de forma simétrica ou assimétrica (Yoon, Nery et al. 2004; Johansson, Cappello et al. 2010; Lehtinen, Zappaterra et al. 2011). Proteínas polarizadas se agregam como complexos apicais com função essencial na autorrenovação e no destino celular, interagindo com vias de sinalização de crescimento celular. Um dos elementos dessa via é *IGF1R* (Margolis and Borg 2005). Essa superfície apical dos precursores neuronais e seus cílios primários mantêm contato direto com o líquido, sugerindo que os fatores secretados podem interagir com os progenitores neuronais nessa interface (Fuchs and Schwark 2004; Kim, Lehtinen et al. 2010). Há descrição de fatores como *Fgf2*, *Shh*, *Igf2*, *Bmp* e ácido retinoico no líquido guiando esses progenitores em ratos, com flutuações ao longo da idade (Martin, Bueno et al. 2006; Huang, Liu et al. 2010; Lehtinen, Zappaterra et al. 2011). A via *Notch* tem papel nessa divisão assimétrica das *RGC* mantendo esses complexos apicais, sendo influenciada pelas vias envolvendo os fatores citados, principalmente a via *SHH* (Shin, Minter et al. 2006; Shimizu, Kagawa et al. 2008; Bultje, Castaneda-Castellanos et al. 2009; Ehm, Goritz et al. 2010). A via *Notch* também regula os níveis de expressão de algumas ciclinas (incluindo ciclina D1) e inibidores de *CDK* e, conseqüentemente, a transição do ciclo celular de G1/S (Ronchini and Capobianco 2001; Guo, Ye et al. 2009; Joshi, Minter et al. 2009; Cohen, Shimizu et al. 2010; Haupt, Borghese et al. 2012; Naganuma, Whelan et al. 2012). Ensaios com bloqueio farmacológico da via *Notch* *in vitro* e *in vivo* por meio de γ -secretase têm mostrado supressão de alvos da via, como *Hes1*, causando saída do ciclo celular e apoptose em tumores cerebrais e outros tumores sistêmicos (Fan, Matsui et al. 2006; Guo, Ye et al. 2009; Chen, Kesari et al. 2010; Fan, Khaki et al. 2010; Takebe, Harris et al. 2011; Naganuma, Whelan et al. 2012; Hales, Taub et al. 2014). A maior expressão de *Notch* apresentou correlação com a localização supratentorial nessa casuística, conforme descrição da literatura. Não houve correlação estatística desse gene com o grau histológico anaplásico como os genes *CCND1*, *FGFRL1* e *IGF2*, podendo-se supor que o

fenótipo anaplásico dos ependimomas na localização supratentorial necessite da interação com uma segunda via de sinalização, além da via *Notch*.

A localização infratentorial tem assinatura genética menos definida que a localização supratentorial e intramedular, talvez pela existência de subgrupos ainda não completamente elucidados nessa região (Johnson, Wright et al. 2010; Witt, Mack et al. 2011). Nesse estudo, o padrão de expressão gênica dos casos infratentoriais foi mais semelhante aos casos intramedulares, com aumento de expressão nos genes *ARMC3* e *DNALI1*, relacionados à ciliogênese, e menor expressão tanto de *CCND1* e *FGFRL1*, relacionados a um perfil proliferativo, quanto de *NOTCH1*, relacionado aos casos supratentoriais. Outras vias de sinalização, que não envolvem a ciclina D1 como alvo principal, mas que podem envolver *IGF2*, e que causam invasão dos tecidos adjacentes e recidiva ou recrescimento das lesões, devem estar presentes nessa localização, pois a evolução clínica dos pacientes com ependimomas na região infratentorial é distinta e pior em relação aos pacientes com lesão intramedular.

A análise da expressão proteica da ciclina D1 foi realizada nesse estudo para comprovação dos resultados de expressão gênica em um número maior de amostras. Há descrição desse marcador como fator prognóstico em outros cânceres, conforme discutido acima, porém com definição pouco precisa da sua importância nos ependimomas. Maiores níveis de expressão de ciclina D1 foram observados nas amostras de tumor de localização supratentorial e nas lesões anaplásicas, confirmando a análise da expressão gênica e conforme descrição por outros autores (Prayson 1998; Korshunov, Neben et al. 2003; Taylor, Poppleton et al. 2005; Palm, Figarella-Branger et al. 2009; Rogers, Mayne et al. 2013). As amostras de tumores de pacientes da população pediátrica também apresentaram maiores níveis de expressão de ciclina D1 em comparação às amostras de pacientes adultos, relação não observada durante a análise da expressão gênica, porém já observada por outro autor (Modena, Lualdi et al. 2006).

A superexpressão da ciclina D1 observada na localização supratentorial foi independente da idade do paciente ou do grau histológico da lesão nesse estudo. Essa observação pode ter relação com a desregulação de vias de sinalização nessa região que tem a ciclina D1 como efetor, já que

translocações e amplificações genômicas no *locus* da ciclina D1 são incomuns nos ependimomas (Kilday, Rahman et al. 2009; Yao, Mack et al. 2011). Deleções e metilações no *locus* do supressor de tumor *p16^{INK4A}* (proteína *CDKN2A*) foram descritas em ependimomas supratentoriais ou anaplásicos (Huang, Starostik et al. 2003; Korshunov, Neben et al. 2003; Rousseau, Ruchoux et al. 2003; Taylor, Poppleton et al. 2005; Godfraind 2009; Johnson, Wright et al. 2010; Korshunov, Witt et al. 2010; Yao, Mack et al. 2011; Modena, Buttarelli et al. 2012; Witt, Korshunov et al. 2012; Kim, Huang et al. 2013; Nagasawa, Trang et al. 2013). *CDKN2A* age inibindo a ligação entre a proteína *CDK4* e ciclina D1, e, assim, previne a fosforilação de Rb (Gadd, Pisc et al. 2001). Há, também, bloqueio da degradação de *MDM2*, aumento da transativação e apoptose dependente de p53 (Freemantle, Liu et al. 2007; Tashiro, Tsuchiya et al. 2007; Liu, Lv et al. 2011). Análise recente da ativação da via *PI3K* nos ependimomas descreveu maior expressão de ciclina D1 em tumores de localização supratentorial (Rogers, Mayne et al. 2013; Parker, Mohankumar et al. 2014). Há interações da via *Notch*, *IGF1R* e via *FGF* com o sistema *PI3K/AKT*, sistema esse que tem um papel crítico na proliferação, progressão do ciclo celular e apoptose em alguns cânceres humanos (Shin, Minter et al. 2006; Palomero, Dominguez et al. 2008; Guo, Ye et al. 2009; Liu, Cheng et al. 2009; Hales, Taub et al. 2014). A via *PI3K* pode induzir a expressão de ciclina D1 por meio da fosforilação de *NF-κB* e a redução da sua degradação por inativação de *GSK3β* (Alao 2007; Freemantle, Liu et al. 2007; Takahashi-Yanaga and Sasaguri 2008; Kim and Diehl 2009; Liu, Cheng et al. 2009; Parker, Mohankumar et al. 2014).

A superexpressão de ciclina D1 foi relacionada com um maior número de recidivas e menor tempo livre de progressão nesse estudo. Outros estudos também evidenciaram menor tempo livre de progressão (Zamecnik, Snuderl et al. 2003; Zawrocki, Izycka-Swieszewska et al. 2011) e maior risco de óbito em pacientes com aumento na expressão de ciclina D1 (Zawrocki, Izycka-Swieszewska et al. 2011). Em análise dos casos de ressecção tumoral completa, identificou-se que essa superexpressão de ciclina D1 pode ser um marcador de predisposição para recidiva e menor tempo livre de progressão devido à desregulação de vias de proliferação conforme citado acima.

Uma complementação do estudo histológico com IHQ para ciclina D1 poderia ajudar na decisão de tratamento durante o seguimento clínico dos pacientes, principalmente os casos supratentoriais com ressecção completa e grau histológico clássico. Além disso, esses casos com superexpressão de ciclina D1 poderiam ser candidatos a estudos com inibições de alvos-chave em convergência da via de sinalização *PI3K*, incluindo *RTKs*, (Liu, Cheng et al. 2009; Guan, Shen et al. 2011; Shonka 2011), além dos agentes para indução da degradação da ciclina e dos inibidores da via *Notch*, conforme citado.

Genes ainda não estudados em ependimomas foram selecionados, com parte deles auxiliando na melhor determinação do perfil de expressão dos casos intramedulares. O estudo da expressão proteica de ciclina D1 por IHQ em uma casuística maior permitiu confirmar as forças de associação evidenciadas pela expressão gênica e a análises de subgrupos, definindo melhor as influências da expressão desse gene na evolução clínica dos pacientes. Estudos multicêntricos com casuísticas maiores e o desenvolvimento de modelos animais auxiliarão no melhor entendimento dos ependimomas como doenças distintas e no desenvolvimento de medicações-alvo em complementação ou até substituição aos tratamentos atualmente disponíveis, à cirurgia e à radioterapia.

7 CONCLUSÃO

As conclusões desse estudo são:

- Fatores clínicos, como idade no diagnóstico, localização do tumor e grau histológico influenciaram na evolução dos pacientes, com menor tempo livre de progressão nos casos pediátricos, na localização intracraniana e nos casos de histologia anaplásica;
- Pacientes com ressecção completa apresentaram maior tempo livre de progressão e maior sobrevida em relação aos pacientes com ressecção incompleta;
- A expressão dos genes *ARMC3*, *DNALI1* e *RSHL3* foi maior na localização intramedular;
- A expressão do gene *CHST5* foi maior nos pacientes adultos e nos casos de localização intramedular;
- A expressão do gene *NOTCH1* foi maior nos casos de localização supratentorial;
- A expressão do gene *IGF2* foi maior nos casos de localização intracraniana e nos pacientes com idade pediátrica;
- A expressão dos genes *CCND1*, *FGFRL1* e *IGF2* foi maior nos casos de histologia anaplásica e nos casos de localização supratentorial;
- Os níveis de expressão gênica de *CCND1* se correlacionaram com a expressão proteica de ciclina D1;
- Houve uma maior expressão da proteína ciclina D1 em casos pediátricos, de localização intracraniana e de histologia anaplásica;
- A proteína ciclina D1 apresentou maior expressão nos casos supratentoriais, independente da idade ou do grau histológico;
- A superexpressão da ciclina D1 se correlacionou com a recidiva e um menor tempo livre de progressão.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 02/02/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1320/09**, intitulado: "**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA DOS EPENDIMOMAS.**" apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Sueli Mieko Oba-Shinjo**

Pesquisador (a) Executante: **Fernanda Gonçalves de Andrade**

CAPPesq, 04 de Fevereiro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

9 REFERÊNCIAS

- Ahmed S (2009). "The culture of neural stem cells." *J Cell Biochem* **106**(1): 1-6.
- Alao JP (2007). "The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention." *Mol Cancer* **6**: 24.
- Alappat S, Zhang ZY, Chen YP (2003). "Msx homeobox gene family and craniofacial development." *Cell Res* **13**(6): 429-42.
- Allali-Hassani A, Pan PW, Dombrovski L, Najmanovich R, Tempel W, Dong A, et al. (2007). "Structural and chemical profiling of the human cytosolic sulfotransferases." *PLoS Biol* **5**(5): e97.
- Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, de Campos JM, Gutierrez M, Rey JA (2004). "Aberrant CpG island methylation of multiple genes in ependymal tumors." *J Neurooncol* **67**(1-2): 159-65.
- Alvino CL, Ong SC, McNeil KA, Delaine C, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE (2011). "Understanding the mechanism of insulin and insulin-like growth factor (IGF) receptor activation by IGF-II." *PLoS One* **6**(11): e27488.
- Amann R, Trueb B (2013). "Evidence that the novel receptor FGFR1L1 signals indirectly via FGFR1." *Int J Mol Med* **32**(5): 983-8.
- Ambros V (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature* **431**(7006): 350-5.
- Amirian ES, Armstrong TS, Aldape KD, Gilbert MR, Scheurer ME (2012). "Predictors of Survival among Pediatric and Adult Ependymoma Cases: A Study Using Surveillance, Epidemiology, and End Results Data from 1973 to 2007." *Neuroepidemiology* **39**(2): 116-24.
- Amirian ES, Armstrong TS, Gilbert MR, Scheurer ME (2012). "Predictors of survival among older adults with ependymoma." *J Neurooncol* **107**(1): 183-9.
- Ammerlaan AC, de Bustos C, Ararou A, Buckley PG, Mantripragada KK, Verstegen MJ, et al. (2005). "Localization of a putative low-penetrance ependymoma susceptibility locus to 22q11 using a chromosome 22 tiling-path genomic microarray." *Genes Chromosomes Cancer* **43**(4): 329-38.
- Andrade FG, de Aguiar PH, Matushita H, Taricco MA, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Teixeira MJ (2009). "Intracranial and spinal ependymoma: series at Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo." *Arq Neuropsiquiatr* **67**(3A): 626-32.

Andreiuolo F, Ferreira C, Puget S, Grill J (2013). "Current and evolving knowledge of prognostic factors for pediatric ependymomas." *Future Oncol* **9**(2): 183-91.

Andreiuolo F, Puget S, Peyre M, Dantas-Barbosa C, Boddaert N, Philippe C, et al. (2010). "Neuronal differentiation distinguishes supratentorial and infratentorial childhood ependymomas." *Neuro Oncol* **12**(11): 1126-34.

Armington WG, Osborn AG, Cubberley DA, Harnsberger HR, Boyer R, Naidich TP, Sherry RG (1985). "Supratentorial ependymoma: CT appearance." *Radiology* **157**(2): 367-72.

Armstrong TS, Vera-Bolanos E, Bekele BN, Aldape K, Gilbert MR (2010). "Adult ependymal tumors: prognosis and the M. D. Anderson Cancer Center experience." *Neuro Oncol* **12**(8): 862-70.

Atkinson JM, Shelat AA, Carcaboso AM, Kranenburg TA, Arnold LA, Boulos N, et al. (2011). "An integrated in vitro and in vivo high-throughput screen identifies treatment leads for ependymoma." *Cancer Cell* **20**(3): 384-99.

Bach A, Lallemand Y, Nicola MA, Ramos C, Mathis L, Maufra M, Robert B (2003). "Msx1 is required for dorsal diencephalon patterning." *Development* **130**(17): 4025-36.

Bagley CA, Wilson S, Kothbauer KF, Bookland MJ, Epstein F, Jallo GI (2009). "Long term outcomes following surgical resection of myxopapillary ependymomas." *Neurosurg Rev* **32**(3): 321-34; discussion 334.

Banoglu E (2000). "Current status of the cytosolic sulfotransferases in the metabolic activation of promutagens and procarcinogens." *Curr Drug Metab* **1**(1): 1-30.

Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R (2009). "Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease." *Endocr Rev* **30**(6): 586-623.

Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T, et al. (2007). "IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro." *Nature* **448**(7157): 1015-21.

Benesch M, Frappaz D, Massimino M (2012). "Spinal cord ependymomas in children and adolescents." *Childs Nerv Syst* **28**(12): 2017-28.

Benesch M, Weber-Mzell D, Gerber NU, von Hoff K, Deinlein F, Krauss J, et al. (2010). "Ependymoma of the spinal cord in children and adolescents: a retrospective series from the HIT database." *J Neurosurg Pediatr* **6**(2): 137-44.

Bergman D, Halje M, Nordin M, Engstrom W (2013). "Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review." *Gerontology* **59**(3): 240-9.

Biernat W, Zawrocki A (2007). "Molecular alterations in ependymomas." *Folia Neuropathol* **45**(4): 155-63.

Biliran H, Jr., Wang Y, Banerjee S, Xu H, Heng H, Thakur A, et al. (2005). "Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line." *Clin Cancer Res* **11**(16): 6075-86.

Boop FA, Sgouros S (2009). "Intracranial ependymoma in children: current status and future trends on diagnosis and management." *Childs Nerv Syst* **25**(10): 1163-5.

Bouffet E, Foreman N (1999). "Chemotherapy for intracranial ependymomas." *Childs Nerv Syst* **15**(10): 563-70.

Bouffet E, Perilongo G, Canete A, Massimino M (1998). "Intracranial ependymomas in children: a critical review of prognostic factors and a plea for cooperation." *Med Pediatr Oncol* **30**(6): 319-29; discussion 329-31.

Bouffet E, Tabori U, Huang A, Bartels U (2009). "Ependymoma: lessons from the past, prospects for the future." *Childs Nerv Syst* **25**(11): 1383-4; author reply 1385.

Brown J, Jones EY, Forbes BE (2009). "Keeping IGF-II under control: lessons from the IGF-II-IGF2R crystal structure." *Trends Biochem Sci* **34**(12): 612-9.

Buccoliero AM, Castiglione F, Rossi Degl'Innocenti D, Sardi I, Genitori L, Taddei GL (2010). "Merlin expression in pediatric anaplastic ependymomas real time PCR study." *Fetal Pediatr Pathol* **29**(4): 245-54.

Bultje RS, Castaneda-Castellanos DR, Jan LY, Jan YN, Kriegstein AR, Shi SH (2009). "Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via notch signaling in the developing neocortex." *Neuron* **63**(2): 189-202.

Cage TA, Clark AJ, Aranda D, Gupta N, Sun PP, Parsa AT, Auguste KI (2013). "A systematic review of treatment outcomes in pediatric patients with intracranial ependymomas." *J Neurosurg_Pediatr* **11**(6): 673-81.

Campbell K, Gotz M (2002). "Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development." *Trends Neurosci* **25**(5): 235-8.

Cappello S, Attardo A, Wu X, Iwasato T, Itohara S, Wilsch-Brauninger M, (2006). "The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface." *Nat Neurosci* **9**(9): 1099-107.

Carboni JM, Wittman M, Yang Z, Lee F, Greer A, Hurlburt W, et al. (2009). "BMS-754807, a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor-1R/IR." *Mol Cancer Ther* **8**(12): 3341-9.

Carter M, Nicholson J, Ross F, Crolla J, Allibone R, Balaji V, et al. (2002). "Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation." *Br J Cancer* **86**(6): 929-39.

Casimiro MC, Velasco-Velazquez M, Aguirre-Alvarado C, Pestell RG (2014). "Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present." *Expert Opin Investig Drugs* **23**(3): 295-304.

Castleman VH, Romio L, Chodhari R, Hirst RA, de Castro SC, Parker KA, et al. (2009). "Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities." *Am J Hum Genet* **84**(2): 197-209.

Catela C, Bilbao-Cortes D, Slonimsky E, Kratsios P, Rosenthal N, Te Welscher P (2009). "Multiple congenital malformations of Wolf-Hirschhorn syndrome are recapitulated in Fgfr1 null mice." *Dis Model Mech* **2**(5-6): 283-94.

Chang UK, Choe WJ, Chung SK, Chung CK, Kim HJ (2002). "Surgical outcome and prognostic factors of spinal intramedullary ependymomas in adults." *J Neurooncol* **57**(2): 133-9.

Chao W, D'Amore PA (2008). "IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease." *Cytokine Growth Factor Rev* **19**(2): 111-20.

Chapman E, Best MD, Hanson SR, Wong CH (2004). "Sulfotransferases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility." *Angew Chem Int Ed Engl* **43**(27): 3526-48.

Chen J, Kesari S, Rooney C, Strack PR, Shen H, Wu L, Griffin JD (2010). "Inhibition of notch signaling blocks growth of glioblastoma cell lines and tumor neurospheres." *Genes Cancer* **1**(8): 822-35.

Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas R (1996). "Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis." *Development* **122**(10): 3035-44.

Chetcuti A, Aktas S, Mackie N, Ulger C, Toruner G, Alkan M, Catchpoole D (2011). "Expression profiling reveals MSX1 and EphB2 expression correlates with the invasion capacity of Wilms tumors." *Pediatr Blood Cancer* **57**(6): 950-7.

Christofori G, Naik P, Hanahan D (1994). "A second signal supplied by insulin-like growth factor II in oncogene-induced tumorigenesis." *Nature* **369**(6479): 414-8.

Clarke MF, Fuller M (2006). "Stem cells and cancer: two faces of eve." *Cell* **124**(6): 1111-5.

Clemmons DR (1997). "Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions." *Cytokine Growth Factor Rev* **8**(1): 45-62.

Cohen B, Shimizu M, Izrailit J, Ng NF, Buchman Y, Pan JG, et al. (2010). "Cyclin D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **123**(1): 113-24.

Cohen E, Binet S, Meininger V (1988). "Ciliogenesis and centriole formation in the mouse embryonic nervous system. An ultrastructural analysis." *Biol Cell* **62**(2): 165-9.

Combs SE, Kelter V, Welzel T, Behnisch W, Kulozik AE, Bischof M, et al. (2008). "Influence of radiotherapy treatment concept on the outcome of patients with localized ependymomas." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **71**(4): 972-8.

Constine LS, Woolf PD, Cann D, Mick G, McCormick K, Raubertas RF, Rubin P (1993). "Hypothalamic-pituitary dysfunction after radiation for brain tumors." *N Engl J Med* **328**(2): 87-94.

Costa FF, Bischof JM, Vanin EF, Lulla RR, Wang M, Sredni ST, et al. (2011). "Identification of microRNAs as potential prognostic markers in ependymoma." *PLoS One* **6**(10): e25114.

di Martino E, Taylor CF, Roulson JA, Knowles MA (2013). "An integrated genomic, transcriptional and protein investigation of FGFR1 as a putative 4p16.3 deletion target in bladder cancer." *Genes Chromosomes Cancer* **52**(9): 860-71.

Donahue B (1992). "Short- and long-term complications of radiation therapy for pediatric brain tumors." *Pediatr Neurosurg* **18**(4): 207-17.

Douglas AE, Heim JA, Shen F, Almada LL, Riobo NA, Fernandez-Zapico ME, Manning DR (2011). "The alpha subunit of the G protein G13 regulates activity of one or more Gli transcription factors independently of smoothened." *J Biol Chem* **286**(35): 30714-22.

Duffner PK, Krischer JP, Sanford RA, Horowitz ME, Burger PC, Cohen ME, et al. (1998). "Prognostic factors in infants and very young children with intracranial ependymomas." *Pediatr Neurosurg* **28**(4): 215-22.

Dyer S, Prebble E, Davison V, Davies P, Ramani P, Ellison D, Grundy R (2002). "Genomic imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups." *Am J Pathol* **161**(6): 2133-41.

Ebert C, von Haken M, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T, von Deimling A (1999). "Molecular genetic analysis of ependymal tumors. NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas." *Am J Pathol* **155**(2): 627-32.

Ehm O, Goritz C, Covic M, Schaffner I, Schwarz TJ, Karaca E, et al. (2010). "RBPJkappa-dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus." *J Neurosci* **30**(41): 13794-807.

Ellison DW, Kocak M, Figarella-Branger D, Felice G, Catherine G, Pietsch T, et al. (2011). "Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts." *J Negat Results Biomed* **10**: 7.

Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, et al. (2010). "NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts." *Stem Cells* **28**(1): 5-16.

Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM, Eberhart CG (2006). "Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors." *Cancer Res* **66**(15): 7445-52.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006). "The epigenetic progenitor origin of human cancer." *Nat Rev Genet* **7**(1): 21-33.

Feldman WB, Clark AJ, Safaee M, Ames CP, Parsa AT (2013). "Tumor control after surgery for spinal myxopapillary ependymomas: distinct outcomes in adults versus children." *J Neurosurg Spine* **19**(4): 471-6.

Fernandez LA, Squatrito M, Northcott P, Awan A, Holland EC, Taylor MD, et al. (2012). "Oncogenic YAP promotes radioresistance and genomic instability in medulloblastoma through IGF2-mediated Akt activation." *Oncogene* **31**(15): 1923-37.

Fernandez-Llebrez P, Grondona JM, Perez J, Lopez-Aranda MF, Estivill-Torres G, Llebrez-Zayas PF, Soriano E, et al. (2004). "Msx1-deficient mice fail to form prosomere 1 derivatives, subcommissural organ, and posterior commissure and develop hydrocephalus." *J Neuropathol Exp Neurol* **63**(6): 574-86.

Figarella-Branger D, Civatte M, Bouvier-Labit C, Gouvernet J, Gambarelli D, Gentet JC, et al. (2000). "Prognostic factors in intracranial ependymomas in children." *J Neurosurg* **93**(4): 605-13.

Fink KL, Rushing EJ, Schold SC, Jr., Nisen PD (1996). "Infrequency of p53 gene mutations in ependymomas." *J Neurooncol* **27**(2): 111-5.

Fleming IN, Hogben M, Frame S, McClue SJ, Green SR (2008). "Synergistic inhibition of ErbB signaling by combined treatment with seliciclib and ErbB-targeting agents." *Clin Cancer Res* **14**(13): 4326-35.

Foreman NK, Love S, Thorne R (1996). "Intracranial ependymomas: analysis of prognostic factors in a population-based series." *Pediatr Neurosurg* **24**(3): 119-25.

Freemantle SJ, Liu X, Feng Q, Galimberti F, Blumen S, Sekula D, et al. (2007). "Cyclin degradation for cancer therapy and chemoprevention." *J Cell Biochem* **102**(4): 869-77.

Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG (2004). "Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions." *Endocrinology* **145**(12): 5439-47.

Fuchs JL, Schwark HD (2004). "Neuronal primary cilia: a review." *Cell Biol Int* **28**(2): 111-8.

Gadd M, Pisc C, Branda J, Ionescu-Tiba V, Nikolic Z, Yang C, et al. (2001). "Regulation of cyclin D1 and p16(INK4A) is critical for growth arrest during mammary involution." *Cancer Res* **61**(24): 8811-9.

Gaiano N, Fishell G (2002). "The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates." *Annu Rev Neurosci* **25**: 471-90.

Gallagher EJ, LeRoith D (2010). "The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer." *Trends Endocrinol Metab* **21**(10): 610-8.

Gardner JA, Ha JH, Jayaraman M, Dhanasekaran DN (2013). "The gep proto-oncogene Galpha13 mediates lysophosphatidic acid-mediated migration of pancreatic cancer cells." *Pancreas* **42**(5): 819-28.

Garvin JH, Jr., Selch MT, Holmes E, Berger MS, Finlay JL, Flannery A, et al. (2012). "Phase II study of pre-irradiation chemotherapy for childhood intracranial ependymoma. Children's Cancer Group protocol 9942: A report from the Children's Oncology Group." *Pediatr Blood Cancer* **59**(7): 1183-9.

Gaspar N, Grill J, Geoerger B, Lellouch-Tubiana A, Michalowski MB, Vassal G (2006). "p53 Pathway dysfunction in primary childhood ependymomas." *Pediatr Blood Cancer* **46**(5): 604-13.

Giannakakou P, Sackett DL, Ward Y, Webster KR, Blagosklonny MV, Fojo T (2000). "p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein." *Nat Cell Biol* **2**(10): 709-17.

Gilbert MR, Ruda R, Soffietti R (2010). "Ependymomas in adults." *Curr Neurol Neurosci Rep* **10**(3): 240-7.

Gilbertson RJ, Bentley L, Hernan R, Junttila TT, Frank AJ, Haapasalo H, et al. (2002). "ERBB receptor signaling promotes ependymoma cell proliferation and represents a potential novel therapeutic target for this disease." *Clin Cancer Res* **8**(10): 3054-64.

Godfraind C (2009). "Classification and controversies in pathology of ependymomas." *Childs Nerv Syst* **25**(10): 1185-93.

Godfraind C, Kaczmarek JM, Kocak M, Dalton J, Wright KD, Sanford RA, et al. (2012). "Distinct disease-risk groups in pediatric supratentorial and posterior fossa ependymomas." *Acta Neuropathol* **124**(2): 247-57.

Goldwein JW, Glauser TA, Packer RJ, Finlay JL, Sutton LN, Curran WJ, et al. (1990). "Recurrent intracranial ependymomas in children. Survival, patterns of failure, and prognostic factors." *Cancer* **66**(3): 557-63.

Greber B, Lehrach H, Adjaye J (2007). "Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal." *BMC Dev Biol* **7**: 46.

Grill J, Bergthold G, Ferreira C (2011). "Pediatric ependymomas: will molecular biology change patient management?" *Curr Opin Oncol* **23**(6): 638-42.

Grill J, Le Deley MC, Gambarelli D, Raquin MA, Couanet D, Pierre-Kahn A, et al. (2001). "Postoperative chemotherapy without irradiation for ependymoma in children under 5 years of age: a multicenter trial of the French Society of Pediatric Oncology." *J Clin Oncol* **19**(5): 1288-96.

Grundy RG, Wilne SA, Weston CL, Robinson K, Lashford LS, Ironside J, et al. (2007). "Primary postoperative chemotherapy without radiotherapy for intracranial ependymoma in children: the UKCCSG/SIOP prospective study." *Lancet Oncol* **8**(8): 696-705.

Guan S, Shen R, Lafortune T, Tiao N, Houghton P, Yung WK, Koul D (2011). "Establishment and characterization of clinically relevant models of ependymoma: a true challenge for targeted therapy." *Neuro Oncol* **13**(7): 748-58.

Guo D, Ye J, Dai J, Li L, Chen F, Ma D, Ji C (2009). "Notch-1 regulates Akt signaling pathway and the expression of cell cycle regulatory proteins cyclin D1, CDK2 and p21 in T-ALL cell lines." *Leuk Res* **33**(5): 678-85.

Gururangan S, Fangusaro J, Young Poussaint T, Onar-Thomas A, Gilbertson RJ, Vajapeyam S, et al. (2012). "Lack of efficacy of bevacizumab + irinotecan in cases of pediatric recurrent ependymoma--a Pediatric Brain Tumor Consortium study." *Neuro Oncol* **14**(11): 1404-12. Erratum in: *Neuro Oncol* **15**(1):132.

Hales EC, Taub JW, Matherly LH (2014). "New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: targeted therapy of gamma-secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Cell Signal* **26**(1): 149-61.

Hall A (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." *Science* **279**(5350): 509-14.

Hamilton DW, Lusher ME, Lindsey JC, Ellison DW, Clifford SC (2005). "Epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in ependymoma." *Cancer Lett* **227**(1): 75-81.

Han J, Ishii M, Bringas P, Jr., Maas RL, Maxson RE, Jr., Chai Y (2007). "Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development." *Mech Dev* **124**(9-10): 729-45.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.

Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, et al. (1998). "Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13." *Science* **280**(5372): 2112-4.

Haupt S, Borghese L, Brustle O, Edenhofer F (2012). "Non-genetic modulation of Notch activity by artificial delivery of Notch intracellular domain into neural stem cells." *Stem Cell Rev* **8**(3): 672-84.

Healey EA, Barnes PD, Kupsky WJ, Scott RM, Sallan SE, Black PM, Tarbell NJ (1991). "The prognostic significance of postoperative residual tumor in ependymoma." *Neurosurgery* **28**(5): 666-671; discussion 671-62.

Hirose Y, Aldape K, Bollen A, James CD, Brat D, Lamborn K, et al. (2001). "Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups." *Am J Pathol* **158**(3): 1137-43.

Holder AM, Klaassens M, Tibboel D, de Klein A, Lee B, Scott DA (2007). "Genetic factors in congenital diaphragmatic hernia." *Am J Hum Genet* **80**(5): 825-45.

Honma S, Saika M, Ohkubo S, Kurose H, Nakahata N (2006). "Thromboxane A2 receptor-mediated G12/13-dependent glial morphological change." *Eur J Pharmacol* **545**(2-3): 100-8.

Horn B, Heideman R, Geyer R, Pollack I, Packer R, Goldwein J, et al. (1999). "A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors." *J Pediatr Hematol Oncol* **21**(3): 203-11.

Hsu W, Pradilla G, Constantini S, Jallo GI (2009). "Surgical considerations of spinal ependymomas in the pediatric population." *Childs Nerv Syst* **25**(10): 1253-9.

Hu G, Lee H, Price SM, Shen MM, Abate-Shen C (2001). "Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1." *Development* **128**(12): 2373-84.

Huang B, Starostik P, Schraut H, Krauss J, Sorensen N, Roggendorf W (2003). "Human ependymomas reveal frequent deletions on chromosomes 6 and 9." *Acta Neuropathol* **106**(4): 357-62.

Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, et al. (2009). "Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation." *Mol Cell* **35**(6): 856-67.

Huang X, Liu J, Ketova T, Fleming JT, Grover VK, Cooper MK, et al. (2010). "Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar Hulsebos TJ, Oskam NT, Bijleveld EH, Westerveld A, Hermesen MA, van den Ouweland AM, et al. (1999). "Evidence for an ependymoma tumour suppressor gene in chromosome region 22pter-22q11.2." *Br J Cancer* **81**(7): 1150-4.

Ibanez-Tallon I, Gorokhova S, Heintz N (2002). "Loss of function of axonemal dynein Mdnah5 causes primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus." *Hum Mol Genet* **11**(6): 715-21.

Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R (2010). "Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains." *J Neurosci* **30**(9): 3489-98.

Jeuken JW, Sprenger SH, Gilhuis J, Teeppen HL, Grotenhuis AJ, Wesseling P (2002). "Correlation between localization, age, and chromosomal imbalances in ependymal tumours as detected by CGH." *J Pathol* **197**(2): 238-44.

Johansson PA, Cappello S, Gotz M (2010). "Stem cells niches during development--lessons from the cerebral cortex." *Curr Opin Neurobiol* **20**(4): 400-7.

Johnson RA, Wright KD, Poppleton H, Mohankumar KM, Finkelstein D, Pounds SB, et al. (2010). "Cross-species genomics matches driver mutations and cell compartments to model ependymoma." *Nature* **466**(7306): 632-6.

Joshi I, Minter LM, Telfer J, Demarest RM, Capobianco AJ, Aster JC, et al. (2009). "Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases." *Blood* **113**(8): 1689-98.

Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H, Imayoshi I (2009). "Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells." *Curr Opin Cell Biol* **21**(6): 733-40.

Karakoula K, Suarez-Merino B, Ward S, Phipps KP, Harkness W, Hayward R, Thompson D, et al. (2008). "Real-time quantitative PCR analysis of pediatric ependymomas identifies novel candidate genes including TPR at 1q25 and CHIBBY at 22q12-q13." *Genes Chromosomes Cancer* **47**(11): 1005-22.

Karp DD, Paz-Ares LG, Novello S, Haluska P, Garland L, Cardenal F, et al. (2009). "Phase II study of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody CP-751,871 in combination with paclitaxel and carboplatin in previously untreated, locally advanced, or metastatic non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **27**(15): 2516-22.

Kastury K, Taylor WE, Shen R, Arver S, Gutierrez M, Fisher CE, et al. (1997). "Complementary deoxyribonucleic acid cloning and characterization of a putative human axonemal dynein light chain gene." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(9): 3047-53.

Kato H, Uchimura I, Morohoshi M, Fujisawa K, Kobayashi Y, Numano F, et al. (1996). "Multiple endocrine neoplasia type 1 associated with spinal ependymoma." *Intern Med* **35**(4): 285-9.

Kawabata Y, Takahashi JA, Arakawa Y, Hashimoto N (2005). "Long-term outcome in patients harboring intracranial ependymoma." *J Neurosurg* **103**(1): 31-7.

Khan AB, D'Souza BJ, Wharam MD, Champion LA, Sinks LF, Woo SY, et al. (1982). "Cisplatin therapy in recurrent childhood brain tumors." *Cancer Treat Rep* **66**(12): 2013-20.

Kilday JP, Rahman R, Dyer S, Ridley L, Lowe J, Coyle B, Grundy R (2009). "Pediatric ependymoma: biological perspectives." *Mol Cancer Res* **7**(6): 765-86.

Kim HJ, Kim TY (2005). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-II in human keratinocytes, differential involvement of mitogen-activated protein kinases and feedback inhibition of protein kinase C." *Br J Dermatol* **152**(3): 418-25.

Kim JH, Huang Y, Griffin AS, Rajappa P, Greenfield JP (2013). "Ependymoma in children: molecular considerations and therapeutic insights." *Clin Transl Oncol* **15**(10): 759-65.

Kim JK, Diehl JA (2009). "Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer." *J Cell Physiol* **220**(2): 292-6.

Kim S, Lehtinen MK, Sessa A, Zappaterra MW, Cho SH, Gonzalez D, et al. (2010). "The apical complex couples cell fate and cell survival to cerebral cortical development." *Neuron* **66**(1): 69-84.

King SM (2000). "The dynein microtubule motor." *Biochim Biophys Acta* **1496**(1): 60-75.

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993). "The new WHO classification of brain tumours." *Brain Pathol* **3**(3): 255-68.

Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, Timirgaz V (2004). "The histologic grade is a main prognostic factor for patients with intracranial ependymomas treated in the microneurosurgical era: an analysis of 258 patients." *Cancer* **100**(6): 1230-7.

Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V (2002). "Immunohistochemical markers for prognosis of ependymal neoplasms." *J Neurooncol* **58**(3): 255-70.

Korshunov A, Neben K, Wrobel G, Tews B, Benner A, Hahn M, et al. (2003). "Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade, and patient age." *Am J Pathol* **163**(5): 1721-7.

Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Benner A, Remke M, Ryzhova M, et al. (2010). "Molecular staging of intracranial ependymoma in children and adults." *J Clin Oncol* **28**(19): 3182-90.

Kosaki K, Ikeda K, Miyakoshi K, Ueno M, Kosaki R, Takahashi D, et al. (2004). "Absent inner dynein arms in a fetus with familial hydrocephalus-situs abnormality." *Am J Med Genet A* **129A**(3): 308-11.

Kraus JA, de Millas W, Sorensen N, Herbold C, Schichor C, Tonn JC, et al. (2001). "Indications for a tumor suppressor gene at 22q11 involved in the pathogenesis of ependymal tumors and distinct from hSNF5/INI1." *Acta Neuropathol* **102**(1): 69-74.

Kuncova K, Janda A, Kasal P, Zamecnik J (2009). "Immunohistochemical prognostic markers in intracranial ependymomas: systematic review and meta-analysis." *Pathol Oncol Res* **15**(4): 605-14.

Kurt E, Zheng PP, Hop WC, van der Weiden M, Bol M, van den Bent MJ, et al. (2006). "Identification of relevant prognostic histopathologic features in 69 intracranial ependymomas, excluding myxopapillary ependymomas and subependymomas." *Cancer* **106**(2): 388-95.

Lehman NL (2008). "Central nervous system tumors with ependymal features: a broadened spectrum of primarily ependymal differentiation?" *J Neuropathol Exp Neurol* **67**(3): 177-88.

Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, et al. (2011). "The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells." *Neuron* **69**(5): 893-905.

Lemon SC, Roy J, Clark MA, Friedmann PD, Rakowski W (2003). "Classification and regression tree analysis in public health: methodological review and comparison with logistic regression." *Ann Behav Med* **26**(3): 172-81.

LeRoith D, Roberts CT, Jr. (2003). "The insulin-like growth factor system and cancer." *Cancer Lett* **195**(2): 127-37.

Li X, Liu B, Ji CN, Kang Y, Mao Y (2006). "Cloning and expression of ARMC3_v2, a novel splicing variant of the human ARMC3 gene." *Genetika* **42**(7): 999-1003.

Little AS, Sheean T, Manoharan R, Darbar A, Teo C (2009). "The management of completely resected childhood intracranial ependymoma: the argument for observation only." *Childs Nerv Syst* **25**(3): 281-4.

- Liu G, Han J, Profirovic J, Strekalova E, Voyno-Yasenetskaya TA (2009). "Galpha13 regulates MEF2-dependent gene transcription in endothelial cells: role in angiogenesis." *Angiogenesis* **12**(1): 1-15.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009). "Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer." *Nat Rev Drug Discov* **8**(8): 627-44.
- Liu W, Lv G, Li Y, Li L, Wang B (2011). "Downregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in malignant gliomas." *J Exp Clin Cancer Res* **30**: 76.
- Liu Y, Helms AW, Johnson JE (2004). "Distinct activities of Msx1 and Msx3 in dorsal neural tube development." *Development* **131**(5): 1017-28.
- Loges NT, Olbrich H, Fenske L, Mussaffi H, Horvath J, Fliegauf M, et al. (2008). "DNAI2 mutations cause primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm." *Am J Hum Genet* **83**(5): 547-58.
- Lonergan KM, Chari R, Deleeuw RJ, Shadeo A, Chi B, Tsao MS, et al. (2006). "Identification of novel lung genes in bronchial epithelium by serial analysis of gene expression." *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**(6): 651-61.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." *Acta Neuropathol* **114**(2): 97-109.
- Luedi PP, Dietrich FS, Weidman JR, Bosko JM, Jirtle RL, Hartemink AJ (2007). "Computational and experimental identification of novel human imprinted genes." *Genome Res* **17**(12): 1723-30.
- Mack SC, Taylor MD (2009). "The genetic and epigenetic basis of ependymoma." *Childs Nerv Syst* **25**(10): 1195-201.
- Mack SC, Witt H, Piro RM, Gu L, Zuyderduyn S, Stutz AM, et al. (2014). "Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy." *Nature* **506**(7489): 445-50.
- Manasa LP, Uppin MS, Sundaram C (2012). "Correlation of p53 and KI-67 expression with grade and subtype of ependymoma." *Indian J Pathol Microbiol* **55**(3): 308-13.
- Margolis B, Borg JP (2005). "Apicobasal polarity complexes." *J Cell Sci* **118**(Pt 22): 5157-9.
- Martin C, Bueno D, Alonso MI, Moro JA, Callejo S, Parada C, et al. (2006). "FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells." *Dev Biol* **297**(2): 402-16.

Massimino M, Solero CL, Garre ML, Biassoni V, Cama A, Genitori L, et al. (2011). "Second-look surgery for ependymoma: the Italian experience." *J Neurosurg Pediatr* **8**(3): 246-50.

McGuire CS, Sainani KL, Fisher PG (2009). "Both location and age predict survival in ependymoma: a SEER study." *Pediatr Blood Cancer* **52**(1): 65-9.

McGuire CS, Sainani KL, Fisher PG (2009). "Incidence patterns for ependymoma: a surveillance, epidemiology, and end results study." *J Neurosurg* **110**(4): 725-9.

McLaughlin MP, Marcus RB, Jr., Buatti JM, McCollough WM, Mickle JP, Kedar A, et al. (1998). "Ependymoma: results, prognostic factors and treatment recommendations." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **40**(4): 845-50.

Mendrzyk F, Korshunov A, Benner A, Toedt G, Pfister S, Radlwimmer B, Lichter P (2006). "Identification of gains on 1q and epidermal growth factor receptor overexpression as independent prognostic markers in intracranial ependymoma." *Clin Cancer Res* **12**(7 Pt 1): 2070-9.

Merchant TE (2009). "Three-dimensional conformal radiation therapy for ependymoma." *Childs Nerv Syst* **25**(10): 1261-8.

Merchant TE, Fouladi M (2005). "Ependymoma: new therapeutic approaches including radiation and chemotherapy." *J Neurooncol* **75**(3): 287-99.

Merchant TE, Haida T, Wang MH, Finlay JL, Leibel SA (1997). "Anaplastic ependymoma: treatment of pediatric patients with or without craniospinal radiation therapy." *J Neurosurg* **86**(6): 943-9.

Merchant TE, Jenkins JJ, Burger PC, Sanford RA, Sherwood SH, Jones-Wallace D, et al. (2002). "Influence of tumor grade on time to progression after irradiation for localized ependymoma in children." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **53**(1): 52-7.

Merchant TE, Kiehna EN, Li C, Xiong X, Mulhern RK (2005). "Radiation dosimetry predicts IQ after conformal radiation therapy in pediatric patients with localized ependymoma." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **63**(5): 1546-54.

Merchant TE, Li C, Xiong X, Kun LE, Boop FA, Sanford RA (2009). "Conformal radiotherapy after surgery for paediatric ependymoma: a prospective study." *Lancet Oncol* **10**(3): 258-66.

Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2004). "Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(50): 17528-32.

Messahel B, Ashley S, Saran F, Ellison D, Ironside J, Phipps K, et al. (2009). "Relapsed intracranial ependymoma in children in the UK: patterns of relapse, survival and therapeutic outcome." *Eur J Cancer* **45**(10): 1815-23.

Metellus P, Barrie M, Figarella-Branger D, Chinot O, Giorgi R, Gouvernet J, et al. (2007). "Multicentric French study on adult intracranial ependymomas: prognostic factors analysis and therapeutic considerations from a cohort of 152 patients." *Brain* **130**(Pt 5): 1338-49.

Metzger AK, Sheffield VC, Duyk G, Daneshvar L, Edwards MS, Cogen PH (1991). "Identification of a germ-line mutation in the p53 gene in a patient with an intracranial ependymoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17): 7825-9.

Michalowski MB, de Fraipont F, Michelland S, Entz-Werle N, Grill J, Pasquier B, et al. (2006). "Methylation of RASSF1A and TRAIL pathway-related genes is frequent in childhood intracranial ependymomas and benign choroid plexus papilloma." *Cancer Genet Cytogenet* **166**(1): 74-81.

Milde T, Hielscher T, Witt H, Kool M, Mack SC, Deubzer HE, et al. (2012). "Nestin Expression Identifies Ependymoma Patients with Poor Outcome." *Brain Pathol* **22**(6): 848-60.

Milde T, Kleber S, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Koch P, et al. (2011). "A novel human high-risk ependymoma stem cell model reveals the differentiation-inducing potential of the histone deacetylase inhibitor Vorinostat." *Acta Neuropathol* **122**(5): 637-50.

Miranda E, Almonacid JA, Rodriguez S, Perez J, Hein S, Cifuentes M, et al. (2001). "Searching for specific binding sites of the secretory glycoproteins of the subcommissural organ." *Microsc Res Tech* **52**(5): 541-51.

Mirzadeh Z, Han YG, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2010). "Cilia organize ependymal planar polarity." *J Neurosci* **30**(7): 2600-10.

Modena P, Buttarelli FR, Miceli R, Piccinin E, Baldi C, Antonelli M, et al. (2012). "Predictors of outcome in an AIEOP series of childhood ependymomas: a multifactorial analysis." *Neuro Oncol* **14**(11): 1346-56.

Modena P, Lualdi E, Facchinetti F, Veltman J, Reid JF, Minardi S, et al. (2006). "Identification of tumor-specific molecular signatures in intracranial ependymoma and association with clinical characteristics." *J Clin Oncol* **24**(33): 5223-33.

Moers A, Nieswandt B, Massberg S, Wettschureck N, Gruner S, Konrad I, et al. (2003). "G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis." *Nat Med* **9**(11): 1418-22.

Monoranu CM, Huang B, Zangen IL, Rutkowski S, Vince GH, Gerber NU, et al. (2008). "Correlation between 6q25.3 deletion status and survival in pediatric intracranial ependymomas." *Cancer Genet Cytogenet* **182**(1): 18-26.

Moreno L, Popov S, Jury A, Al Sarraj S, Jones C, Zacharoulis S (2013). "Role of platelet derived growth factor receptor (PDGFR) over-expression and angiogenesis in ependymoma." *J Neurooncol* **111**(2): 169-76.

Morin RD, Mungall K, Pleasance E, Mungall AJ, Goya R, Huff RD, et al. (2013). "Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing." *Blood* **122**(7): 1256-65.

Mork SJ, Loken AC (1977). "Ependymoma: a follow-up study of 101 cases." *Cancer* **40**(2): 907-15.

Mulhern RK, Merchant TE, Gajjar A, Reddick WE, Kun LE (2004). "Late neurocognitive sequelae in survivors of brain tumours in childhood." *Lancet Oncol* **5**(7): 399-408.

Mullins KJ, Rubio A, Myers SP, Korones DN, Pilcher WH (1998). "Malignant ependymomas in a patient with Turcot's syndrome: case report and management guidelines." *Surg Neurol* **49**(3): 290-4.

Naganuma S, Whelan KA, Natsuizaka M, Kagawa S, Kinugasa H, Chang S, et al. (2012). "Notch receptor inhibition reveals the importance of cyclin D1 and Wnt signaling in invasive esophageal squamous cell carcinoma." *Am J Cancer Res* **2**(4): 459-75.

Nagasawa DT, Trang A, Choy W, Spasic M, Yew A, Zarinkhou G, et al. (2013). "Genetic expression profiles of adult and pediatric ependymomas: molecular pathways, prognostic indicators, and therapeutic targets." *Clin Neurol Neurosurg* **115**(4): 388-99.

Nazar GB, Hoffman HJ, Becker LE, Jenkin D, Humphreys RP, Hendrick EB (1990). "Infratentorial ependymomas in childhood: prognostic factors and treatment." *J Neurosurg* **72**(3): 408-17.

Needle MN, Goldwein JW, Grass J, Cnaan A, Bergman I, Molloy P, et al. (1997). "Adjuvant chemotherapy for the treatment of intracranial ependymoma of childhood." *Cancer* **80**(2): 341-7.

Oh MC, Ivan ME, Sun MZ, Kaur G, Safaee M, Kim JM, et al. (2013). "Adjuvant radiotherapy delays recurrence following subtotal resection of spinal cord ependymomas." *Neuro Oncol* **15**(2): 208-15.

Okada T, Akada M, Fujita T, Iwata T, Goto Y, Kido K, et al. (2006). "A novel cancer testis antigen that is frequently expressed in pancreatic, lung, and endometrial cancers." *Clin Cancer Res* **12**(1): 191-7.

Onilude OE, Lusher ME, Lindsey JC, Pearson AD, Ellison DW, Clifford SC (2006). "APC and CTNNB1 mutations are rare in sporadic ependymomas." *Cancer Genet Cytogenet* **168**(2): 158-61.

Palm T, Figarella-Branger D, Chapon F, Lacroix C, Gray F, Scaravilli F, et al. (2009). "Expression profiling of ependymomas unravels localization and tumor grade-specific tumorigenesis." *Cancer* **115**(17): 3955-68.

Palma L, Celli P, Mariottini A, Zalaffi A, Schettini G (2000). "The importance of surgery in supratentorial ependymomas. Long-term survival in a series of 23 cases." *Childs Nerv Syst* **16**(3): 170-5.

Palomero T, Dominguez M, Ferrando AA (2008). "The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia." *Cell Cycle* **7**(8): 965-70.

Parker M, Mohankumar KM, Punchihewa C, Weinlich R, Dalton JD, Li Y, et al. (2014). "C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-kappaB signalling in ependymoma." *Nature* **506**(7489): 451-5.

Paul P, Suwan J, Liu J, Dordick JS, Linhardt RJ (2012). "Recent advances in sulfotransferase enzyme activity assays." *Anal Bioanal Chem* **403**(6): 1491-1500.

Paulino AC, Wen BC, Buatti JM, Hussey DH, Zhen WK, Mayr NA, Menezes AH (2002). "Intracranial ependymomas: an analysis of prognostic factors and patterns of failure." *Am J Clin Oncol* **25**(2): 117-22.

Perilongo G, Massimino M, Sotti G, Belfontali T, Masiero L, Rigobello L, et al. (1997). "Analyses of prognostic factors in a retrospective review of 92 children with ependymoma: Italian Pediatric Neuro-oncology Group." *Med Pediatr Oncol* **29**(2): 79-85.

Pestell RG (2013). "New roles of cyclin D1." *Am J Pathol* **183**(1): 3-9.

Pfaffl MW (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.

Phi JH, Wang KC, Park SH, Kim IH, Kim IO, Park KD, et al. (2012). "Pediatric infratentorial ependymoma: prognostic significance of anaplastic histology." *J Neurooncol* **106**(3): 619-26.

Pollack IF, Gerszten PC, Martinez AJ, Lo KH, Shultz B, Albright AL, et al. (1995). "Intracranial ependymomas of childhood: long-term outcome and prognostic factors." *Neurosurgery* **37**(4): 655-66; discussion 666-7.

Poppleton H, Gilbertson RJ (2007). "Stem cells of ependymoma." *Br J Cancer* **96**(1): 6-10.

Prayson RA (1998). "Cyclin D1 and MIB-1 immunohistochemistry in ependymomas: a study of 41 cases." *Am J Clin Pathol* **110**(5): 629-34.

Preusser M, Wolfsberger S, Czech T, Slavc I, Budka H, Hainfellner JA (2005). "Survivin expression in intracranial ependymomas and its correlation with tumor cell proliferation and patient outcome." *Am J Clin Pathol* **124**(4): 543-9.

Puget S, Grill J, Valent A, Bieche I, Dantas-Barbosa C, Kauffmann A, et al. (2009). "Candidate genes on chromosome 9q33-34 involved in the progression of childhood ependymomas." *J Clin Oncol* **27**(11): 1884-92.

Raghunathan A, Wani K, Armstrong TS, Vera-Bolanos E, Fouladi M, Gilbertson R, et al. (2013). "Histological predictors of outcome in ependymoma are dependent on anatomic site within the central nervous system." *Brain Pathol* **23**(5):584-94.

Ramos C, Martinez A, Robert B, Soriano E (2004). "Msx1 expression in the adult mouse brain: characterization of populations of beta-galactosidase-positive cells in the hippocampus and fimbria." *Neuroscience* **127**(4): 893-900.

Ramos C, Robert B (2005). "msh/Msx gene family in neural development." *Trends Genet* **21**(11): 624-32.

Rand V, Prebble E, Ridley L, Howard M, Wei W, Brundler MA, et al. (2008). "Investigation of chromosome 1q reveals differential expression of members of the S100 family in clinical subgroups of intracranial paediatric ependymoma." *Br J Cancer* **99**(7): 1136-43.

Rao G, Pedone CA, Del Valle L, Reiss K, Holland EC, Fults DW (2004). "Sonic hedgehog and insulin-like growth factor signaling synergize to induce medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice." *Oncogene* **23**(36): 6156-62.

Rasheed SA, Teo CR, Beillard EJ, Voorhoeve PM, Casey PJ (2013). "MicroRNA-182 and microRNA-200a control G-protein subunit alpha-13 (GNA13) expression and cell invasion synergistically in prostate cancer cells." *J Biol Chem* **288**(11): 7986-95.

Rashid S, Breckle R, Hupe M, Geisler S, Doerwald N, Neesen J (2006). "The murine Dnali1 gene encodes a flagellar protein that interacts with the cytoplasmic dynein heavy chain 1." *Mol Reprod Dev* **73**(6): 784-94.

Rath VL, Verdugo D, Hemmerich S (2004). "Sulfotransferase structural biology and inhibitor discovery." *Drug Discov Today* **9**(23): 1003-11.

Reardon DA, Entrekina RE, Sublett J, Ragsdale S, Li H, Boyett J, et al. (1999). "Chromosome arm 6q loss is the most common recurrent autosomal alteration detected in primary pediatric ependymoma." *Genes Chromosomes Cancer* **24**(3): 230-7.

Reni M, Brandes AA, Vavassori V, Cavallo G, Casagrande F, Vastola F, et al. (2004). "A multicenter study of the prognosis and treatment of adult brain ependymal tumors." *Cancer* **100**(6): 1221-9.

Reni M, Gatta G, Mazza E, Vecht C (2007). "Ependymoma." *Crit Rev Oncol Hematol* **63**(1): 81-9.

Ridley L, Rahman R, Brundler MA, Ellison D, Lowe J, Robson K, et al. (2008). "Multifactorial analysis of predictors of outcome in pediatric intracranial ependymoma." *Neuro Oncol* **10**(5): 675-89.

Rieckmann T, Zhuang L, Fluck CE, Trueb B (2009). "Characterization of the first FGFR1 mutation identified in a craniosynostosis patient." *Biochim Biophys Acta* **1792**(2): 112-21.

Robert B, Sassoon D, Jacq B, Gehring W, Buckingham M (1989). "Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis." *EMBO J* **8**(1): 91-100.

Robertson PL, Zeltzer PM, Boyett JM, Rorke LB, Allen JC, Geyer JR, et al. (1998). "Survival and prognostic factors following radiation therapy and chemotherapy for ependymomas in children: a report of the Children's Cancer Group." *J Neurosurg* **88**(4): 695-703.

Rodriguez D, Cheung MC, Housri N, Quinones-Hinojosa A, Camphausen K, Koniaris LG (2009). "Outcomes of malignant CNS ependymomas: an examination of 2408 cases through the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database (1973-2005)." *J Surg Res* **156**(2): 340-51.

Rodriguez EM, Rodriguez S, Hein S (1998). "The subcommissural organ." *Microsc Res Tech* **41**(2): 98-123.

Rogers HA, Kilday JP, Mayne C, Ward J, Adamowicz-Brice M, Schwalbe EC, et al. (2012). "Supratentorial and spinal pediatric ependymomas display a hypermethylated phenotype which includes the loss of tumor suppressor genes involved in the control of cell growth and death." *Acta Neuropathol* **123**(5): 711-25.

Rogers HA, Mayne C, Chapman RJ, Kilday JP, Coyle B, Grundy RG (2013). "PI3K Pathway Activation Provides a Novel Therapeutic Target for Pediatric Ependymoma and Is an Independent Marker of Progression-Free Survival." *Clin Cancer Res* **19**(23): 6450-60.

Rogers L, Pueschel J, Spetzler R, Shapiro W, Coons S, Thomas T, Speiser B (2005). "Is gross-total resection sufficient treatment for posterior fossa ependymomas?" *J Neurosurg* **102**(4): 629-36.

Ronchini C, Capobianco AJ (2001). "Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic)." *Mol Cell Biol* **21**(17): 5925-34.

Rossler R, Boddeke E, Copray S (2010). "Differentiation of non-mesencephalic neural stem cells towards dopaminergic neurons." *Neuroscience* **170**(2): 417-28.

Rousseau A, Idhah A, Ducray F, Criniere E, Fevre-Montange M, Jouvett A, Delattre JY (2010). "Specific chromosomal imbalances as detected by array CGH in ependymomas in association with tumor location, histological subtype and grade." *J Neurooncol* **97**(3): 353-64.

Rousseau E, Palm T, Scaravilli F, Ruchoux MM, Figarella-Branger D, Salmon I, et al. (2007). "Trisomy 19 ependymoma, a newly recognized genetico-histological association, including clear cell ependymoma." *Mol Cancer* **6**: 47.

Rousseau E, Ruchoux MM, Scaravilli F, Chapon F, Vinchon M, De Smet C, et al. (2003). "CDKN2A, CDKN2B and p14ARF are frequently and differentially methylated in ependymal tumours." *Neuropathol Appl Neurobiol* **29**(6): 574-83.

Rousseau P, Habrand JL, Sarrazin D, Kalifa C, Terrier-Lacombe MJ, Rekacewicz C, Rey A (1994). "Treatment of intracranial ependymomas of children: review of a 15-year experience." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **28**(2): 381-6.

Roybon L, Hjalt T, Christophersen NS, Li JY, Brundin P (2008). "Effects on differentiation of embryonic ventral midbrain progenitors by Lmx1a, Msx1, Ngn2, and Pitx3." *J Neurosci* **28**(14): 3644-56.

Rubio MP, Correa KM, Ramesh V, MacCollin MM, Jacoby LB, von Deimling A, et al. (1994). "Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas." *Cancer Res* **54**(1): 45-7.

Ruppel KM, Willison D, Kataoka H, Wang A, Zheng YW, Cornelissen I, et al. (2005). "Essential role for Galpha13 in endothelial cells during embryonic development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8281-6.

Saadi I, Das P, Zhao M, Raj L, Ruspita I, Xia Y, et al. (2013). "Msx1 and Tbx2 antagonistically regulate Bmp4 expression during the bud-to-cap stage transition in tooth development." *Development* **140**(13): 2697-2702.

Sailer MH, Gerber A, Tostado C, Hutter G, Cordier D, Mariani L, Ritz MF (2013). "Non-invasive neural stem cells become invasive in vitro by combined FGF2 and BMP4 signaling." *J Cell Sci* **126**(Pt 16): 3533-40.

Salazar OM, Castro-Vita H, VanHoutte P, Rubin P, Aygun C (1983). "Improved survival in cases of intracranial ependymoma after radiation therapy. Late report and recommendations." *J Neurosurg* **59**(4): 652-9.

Sanford RA, Merchant TE, Zwienerberg-Lee M, Kun LE, Boop FA (2009). "Advances in surgical techniques for resection of childhood cerebellopontine angle ependymomas are key to survival." *Childs Nerv Syst* **25**(10): 1229-40.

Satokata I, Maas R (1994). "Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development." *Nat Genet* **6**(4): 348-56.

Schiewe AJ, Haworth IS (2007). "Structure-based prediction of MHC-peptide association: algorithm comparison and application to cancer vaccine design." *J Mol Graph Model* **26**(3): 667-75.

Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Migheli A, Palma L, Pollo B, et al. (1991). "Histologic prognostic factors in ependymoma." *Childs Nerv Syst* **7**(4): 177-82.

Schild C, Trueb B (2005). "Aberrant expression of FGFR1, a novel FGF receptor, in ovarian tumors." *Int J Mol Med* **16**(6): 1169-73.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." *Nat Protoc* **3**(6): 1101-8.

Schneider D, Monoranu CM, Huang B, Rutkowski S, Gerber NU, Krauss J, et al. (2009). "Pediatric supratentorial ependymomas show more frequent deletions on chromosome 9 than infratentorial ependymomas: a microsatellite analysis." *Cancer Genet Cytogenet* **191**(2): 90-6.

Schwartz TH, McCormick PC (2000). "Intramedullary ependymomas: clinical presentation, surgical treatment strategies and prognosis." *J Neurooncol* **47**(3): 211-8.

Segall HD, Batnitzky S, Zee CS, Ahmadi J, Bird CR, Cohen ME (1985). "Computed tomography in the diagnosis of intracranial neoplasms in children." *Cancer* **56**(7 Suppl): 1748-55.

Segall HD, Zee CS, Naidich TP, Ahmadi J, Becker TS (1982). "Computed tomography in neoplasms of the posterior fossa in children." *Radiol Clin North Am* **20**(1): 237-53.

Senetta R, Miracco C, Lanzafame S, Chiusa L, Caltabiano R, Galia A, et al. (2011). "Epidermal growth factor receptor and caveolin-1 coexpression identifies adult supratentorial ependymomas with rapid unfavorable outcomes." *Neuro Oncol* **13**(2): 176-83.

Sexauer CL, Khan A, Burger PC, Krischer JP, van Eys J, Vats T, Ragab AH (1985). "Cisplatin in recurrent pediatric brain tumors. A POG Phase II study. A Pediatric Oncology Group Study." *Cancer* **56**(7): 1497-501.

Sgouros S, Malluci CL, Jackowski A (1996). "Spinal ependymomas--the value of postoperative radiotherapy for residual disease control." *Br J Neurosurg* **10**(6): 559-66.

Shan D, Chen L, Wang D, Tan YC, Gu JL, Huang XY (2006). "The G protein G alpha(13) is required for growth factor-induced cell migration." *Dev Cell* **10**(6): 707-18.

Shan J, Zhao W, Gu W (2009). "Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation." *Mol Cell* **36**(3): 469-76.

Sharma MC, Ghara N, Jain D, Sarkar C, Singh M, Mehta VS (2009). "A study of proliferative markers and tumor suppressor gene proteins in different grades of ependymomas." *Neuropathology* **29**(2): 148-55.

Shibuya M, Claesson-Welsh L (2006). "Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." *Exp Cell Res* **312**(5): 549-60.

Shim KW, Kim DS, Choi JU (2009). "The history of ependymoma management." *Childs Nerv Syst* **25**(10): 1167-83.

Shimizu T, Kagawa T, Inoue T, Nonaka A, Takada S, Aburatani H, Taga T (2008). "Stabilized beta-catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-Jkappa complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells." *Mol Cell Biol* **28**(24): 7427-41.

Shin HM, Minter LM, Cho OH, Gottipati S, Fauq AH, Golde TE, et al. (2006). "Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention." *EMBO J* **25**(1): 129-38.

Shitamukai A, Matsuzaki F (2012). "Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors." *Dev Growth Differ* **54**(3): 277-86.

Shonka NA (2011). "Targets for therapy in ependymoma." *Target Oncol* **6**(3): 163-9.

Shu HK, Sall WF, Maity A, Tochner ZA, Janss AJ, Belasco JB, et al. (2007). "Childhood intracranial ependymoma: twenty-year experience from a single institution." *Cancer* **110**(2): 432-41.

Sivaraj KK, Takefuji M, Schmidt I, Adams RH, Offermanns S, Wettschureck N (2013). "G13 controls angiogenesis through regulation of VEGFR-2 expression." *Dev Cell* **25**(4): 427-34.

Steinberg F, Zhuang L, Beyeler M, Kalin RE, Mullis PE, Brandli AW, Trueb B (2010). "The FGFR1 receptor is shed from cell membranes, binds fibroblast growth factors (FGFs), and antagonizes FGF signaling in *Xenopus* embryos." *J Biol Chem* **285**(3): 2193-202.

Steinbok P, Hentschel S, Cochrane DD, Kestle JR (1996). "Value of postoperative surveillance imaging in the management of children with some common brain tumors." *J Neurosurg* **84**(5): 726-32.

Stephen JH, Sievert AJ, Madsen PJ, Judkins AR, Resnick AC, Storm PB, et al. (2012). "Spinal cord ependymomas and myxopapillary ependymomas in the first 2 decades of life: a clinicopathological and immunohistochemical characterization of 19 cases." *J Neurosurg Pediatr* **9**(6): 646-53.

Suarez-Merino B, Hubank M, Revesz T, Harkness W, Hayward R, Thompson D, et al. (2005). "Microarray analysis of pediatric ependymoma identifies a cluster of 112 candidate genes including four transcripts at 22q12.1-q13.3." *Neuro Oncol* **7**(1): 20-31.

Sung KW, Lim do H, Lee SH, Yoo KH, Koo HH, Kim JH, et al. (2012). "Tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation for anaplastic ependymoma in children younger than 3 years of age." *J Neurooncol* **107**(2): 335-42.

Sutton LN, Goldwein J, Perilongo G, Lang B, Schut L, Rorke L, Packer R (1990). "Prognostic factors in childhood ependymomas." *Pediatr Neurosurg* **16**(2): 57-65.

Tabori U, Ma J, Carter M, Zielenska M, Rutka J, Bouffet E, et al. (2006). "Human telomere reverse transcriptase expression predicts progression and survival in pediatric intracranial ependymoma." *J Clin Oncol* **24**(10): 1522-8.

Tabori U, Wong V, Ma J, Shago M, Alon N, Rutka J, et al. (2008). "Telomere maintenance and dysfunction predict recurrence in paediatric ependymoma." *Br J Cancer* **99**(7): 1129-35.

Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T (2008). "GSK-3 β regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy." *Cell Signal* **20**(4): 581-9.

Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP (2011). "Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways." *Nat Rev Clin Oncol* **8**(2): 97-106.

Tamiolakis D, Papadopoulos N, Venizelos I, Lambropoulou M, Nikolaidou S, Bolioti S, et al. (2006). "Loss of chromosome 1 in myxopapillary ependymoma suggests a region out of chromosome 22 as critical for tumour biology: a FISH analysis of four cases on touch imprint smears." *Cytopathology* **17**(4): 199-204.

Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M (2007). "Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression." *Cancer Sci* **98**(5): 629-35.

Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, Su X, Liu Y, Jensen P, et al. (2005). "Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma." *Cancer Cell* **8**(4): 323-35.

Tihan T, Zhou T, Holmes E, Burger PC, Ozuysal S, Rushing EJ (2008). "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* **21**(2): 165-77.

Timmermann B, Kortmann RD, Kuhl J, Meisner C, Slavc I, Pietsch T, Bamberg M (2000). "Combined postoperative irradiation and chemotherapy for anaplastic ependymomas in childhood: results of the German prospective trials HIT 88/89 and HIT 91." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **46**(2): 287-95.

Toretsky JA, Helman LJ (1996). "Involvement of IGF-II in human cancer." *J Endocrinol* **149**(3): 367-72.

Torres CF, Korones DN, Pilcher W (1997). "Multiple ependymomas in a patient with Turcot's syndrome." *Med Pediatr Oncol* **28**(1): 59-61.

Trueb B (2011). "Biology of FGFR1, the fifth fibroblast growth factor receptor." *Cell Mol Life Sci* **68**(6): 951-64.

Trueb B, Taeschler S (2006). "Expression of FGFR1, a novel fibroblast growth factor receptor, during embryonic development." *Int J Mol Med* **17**(4): 617-20.

Tsuchiya S, Fujiwara T, Sato F, Shimada Y, Tanaka E, Sakai Y, et al. (2011). "MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFR1)." *J Biol Chem* **286**(1): 420-8.

Uchimura K, Muramatsu H, Kaname T, Ogawa H, Yamakawa T, Fan QW, et al. (1998). "Human N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase involved in the biosynthesis of 6-sulfo sialyl Lewis X: molecular cloning, chromosomal mapping, and expression in various organs and tumor cells." *J Biochem* **124**(3): 670-8.

Vaidya K, Smee R, Williams JR (2012). "Prognostic factors and treatment options for paediatric ependymomas." *J Clin Neurosci* **19**(9): 1228-35.

Vaisberg EA, Grissom PM, McIntosh JR (1996). "Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles." *J Cell Biol* **133**(4): 831-42.

Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SK, et al. (2009). "Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR." *BMC Mol Biol* **10**: 17.

van Veelen-Vincent ML, Pierre-Kahn A, Kalifa C, Sainte-Rose C, Zerah M, Thorne J, Renier D (2002). "Ependymoma in childhood: prognostic factors, extent of surgery, and adjuvant therapy." *J Neurosurg* **97**(4): 827-35.

Vanuytsel L, Brada M (1991). "The role of prophylactic spinal irradiation in localized intracranial ependymoma." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **21**(3): 825-30.

Venkatramani R, Dhall G, Patel M, Grimm J, Hawkins C, McComb G, et al. (2012). "Supratentorial ependymoma in children: to observe or to treat following gross total resection?" *Pediatr Blood Cancer* **58**(3): 380-3.

Verma A, Zhou H, Chin S, Bruggers C, Kestle J, Khatua S (2012). "EGFR as a predictor of relapse in myxopapillary ependymoma." *Pediatr Blood Cancer* **59**(4): 746-8.

Vieux-Rochas M, Bouhali K, Mantero S, Garaffo G, Provero P, Astigiano S, et al. (2013). "BMP-mediated functional cooperation between Dlx5/Dlx6 and Msx1/Msx2 during mammalian limb development." *PLoS One* **8**(1): e51700.

von Haken MS, White EC, Daneshvar-Shyesther L, Sih S, Choi E, Kalra R, Cogen PH (1996). "Molecular genetic analysis of chromosome arm 17p and chromosome arm 22q DNA sequences in sporadic pediatric ependymomas." *Genes Chromosomes Cancer* **17**(1): 37-44.

von Hoff K, Kieffer V, Habrand JL, Kalifa C, Dellatolas G, Grill J (2008). "Impairment of intellectual functions after surgery and posterior fossa irradiation in children with ependymoma is related to age and neurologic complications." *BMC Cancer* **8**: 15.

Waha A, Koch A, Hartmann W, Mack H, Schramm J, Sorensen N, et al. (2004). "Analysis of HIC-1 methylation and transcription in human ependymomas." *Int J Cancer* **110**(4): 542-9.

Waldron JN, Laperriere NJ, Jaakkimainen L, Simpson WJ, Payne D, Milosevic M, Wong CS (1993). "Spinal cord ependymomas: a retrospective analysis of 59 cases." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **27**(2): 223-9.

Walker RW, Allen JC (1988). "Cisplatin in the treatment of recurrent childhood primary brain tumors." *J Clin Oncol* **6**(1): 62-6.

Wang C, Lisanti MP, Liao DJ (2011). "Reviewing once more the c-myc and Ras collaboration: converging at the cyclin D1-CDK4 complex and challenging basic concepts of cancer biology." *Cell Cycle* **10**(1): 57-67.

Wang J, Wang Q, Cui Y, Liu ZY, Zhao W, Wang CL, et al. (2012). "Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells." *J Neurooncol* **106**(3): 473-84.

Wang Y, Lipari P, Wang X, Hailey J, Liang L, Ramos R, et al. (2010). "A fully human insulin-like growth factor-I receptor antibody SCH 717454 (Robatumumab) has antitumor activity as a single agent and in combination with cytotoxics in pediatric tumor xenografts." *Mol Cancer Ther* **9**(2): 410-18.

Wani K, Armstrong TS, Vera-Bolanos E, Raghunathan A, Ellison D, Gilbertson R, et al. (2012). "A prognostic gene expression signature in infratentorial ependymoma." *Acta Neuropathol* **123**(5): 727-38.

Ward S, Harding B, Wilkins P, Harkness W, Hayward R, Darling JL, et al. (2001). "Gain of 1q and loss of 22 are the most common changes detected by comparative genomic hybridisation in paediatric ependymoma." *Genes Chromosomes Cancer* **32**(1): 59-66.

Weremowicz S, Kupsky WJ, Morton CC, Fletcher JA (1992). "Cytogenetic evidence for a chromosome 22 tumor suppressor gene in ependymoma." *Cancer Genet Cytogenet* **61**(2): 193-6.

Wiedemann M, Trueb B (2001). "The mouse Fgfr1 gene coding for a novel FGF receptor-like protein." *Biochim Biophys Acta* **1520**(3): 247-50.

Witt H, Korshunov A, Pfister SM, Milde T (2012). "Molecular approaches to ependymoma: the next step(s)." *Curr Opin Neurol* **25**(6): 745-50.

Witt H, Mack SC, Ryzhova M, Bender S, Sill M, Isserlin R, et al. (2011). "Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma." *Cancer Cell* **20**(2): 143-57.

Wolfsberger S, Fischer I, Hoftberger R, Birner P, Slavc I, Dieckmann K, Czech T, et al. (2004). "Ki-67 immunolabeling index is an accurate predictor of outcome in patients with intracranial ependymoma." *Am J Surg Pathol* **28**(7): 914-20.

Worzfeld T, Wettschureck N, Offermanns S (2008). "G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease." *Trends Pharmacol Sci* **29**(11): 582-9.

Wright KD, Gajjar A (2009). "New chemotherapy strategies and biological agents in the treatment of childhood ependymoma." *Childs Nerv Syst* **25**(10): 1275-82.

Wright KD, Gajjar A (2012). "Current Treatment Options for Pediatric and Adult Patients With Ependymoma." *Curr Treat Options Oncol* **13**(4): 465-77.

Yakar S, Leroith D, Brodt P (2005). "The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models." *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(4-5): 407-20.

Yao Y, Mack SC, Taylor MD (2011). "Molecular genetics of ependymoma." *Chin J Cancer* **30**(10): 669-81.

- Yokota T, Kouno J, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, Matsumoto K, et al. (2006). "Identification of histological markers for malignant glioma by genome-wide expression analysis: dynein, alpha-PIX and sorcin." *Acta Neuropathol* **111**(1): 29-38.
- Yoon K, Nery S, Rutlin ML, Radtke F, Fishell G, Gaiano N (2004). "Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors." *J Neurosci* **24**(43): 9497-506.
- Young A, Dictenberg JB, Purohit A, Tuft R, Doxsey SJ (2000). "Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes." *Mol Biol Cell* **11**(6): 2047-56.
- Yuh EL, Barkovich AJ, Gupta N (2009). "Imaging of ependymomas: MRI and CT." *Childs Nerv Syst* **25**(10): 1203-13.
- Zacharoulis S, Ashley S, Moreno L, Gentet JC, Massimino M, Frappaz D (2010). "Treatment and outcome of children with relapsed ependymoma: a multi-institutional retrospective analysis." *Childs Nerv Syst* **26**(7): 905-11.
- Zacharoulis S, Ji L, Pollack IF, Duffner P, Geyer R, Grill J, et al. (2008). "Metastatic ependymoma: a multi-institutional retrospective analysis of prognostic factors." *Pediatr Blood Cancer* **50**(2): 231-5.
- Zacharoulis S, Moreno L (2009). "Ependymoma: an update." *J Child Neurol* **24**(11): 1431-8.
- Zamecnik J, Snuderl M, Eckschlager T, Chanova M, Hladikova M, Tichy M, Kodet R (2003). "Pediatric intracranial ependymomas: prognostic relevance of histological, immunohistochemical, and flow cytometric factors." *Mod Pathol* **16**(10): 980-91.
- Zawrocki A, Izycka-Swieszewska E, Papierz W, Liberski PP, Zakrzewski K, Biernat W (2011). "Analysis of the prognostic significance of selected morphological and immunohistochemical markers in ependymomas, with literature review." *Folia Neuropathol* **49**(2): 94-102.
- Zheng PP, Pang JC, Hui AB, Ng HK (2000). "Comparative genomic hybridization detects losses of chromosomes 22 and 16 as the most common recurrent genetic alterations in primary ependymomas." *Cancer Genet Cytogenet* **122**(1): 18-25.
- Zhuang L, Villiger P, Trueb B (2011). "Interaction of the receptor FGFR1 with the negative regulator Spry1." *Cell Signal* **23**(9): 1496-1504.
- Zietkiewicz E, Bukowy-Bieryllo Z, Voelkel K, Klimek B, Dmenska H, Pogorzelski A, et al. (2012). "Mutations in radial spoke head genes and ultrastructural cilia defects in East-European cohort of primary ciliary dyskinesia patients." *PLoS One* **7**(3): e33667.

APÊNDICE

Apêndice 1

Fernanda Andrade <fandrade87@gmail.com>

Submission Confirmation for Cyclin D1 gene and protein expression in ependymomas: correlation with tumor location, tumor grade, patient age and relapse - [EMID:531256643263a35b]

Neuro-Oncology <neuonc.editorialoffice@oup.com>
To: Fernanda Andrade <fandrade87@gmail.com>

Thu, Apr 3, 2014 at 11:46 AM

Dear Dr. Andrade,

Your submission entitled "Cyclin D1 gene and protein expression in ependymomas: correlation with tumor location, tumor grade, patient age and relapse" has been received by Neuro-Oncology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://n-o.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned. Dr. Patrick Wen, the incoming Editor-In-Chief of Neuro-Oncology will oversee the review process.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Elizabeth Martinson, Ph.D.
Managing Editor
Neuro-Oncology

Apêndice 2

Fernanda Andrade <fandrade87@gmail.com>

A manuscript number has been assigned to Cyclin D1 gene and protein expression in ependymomas: correlation with tumor location, tumor grade, patient age and relapse - [EMID:0a9d030dd55423e8]

Neuro-Oncology <neuonc.editorialoffice@oup.com>
To: Fernanda Andrade <fandrade87@gmail.com>

Sun, Apr 6, 2014 at 5:34 AM

Dear Dr. Andrade,

Your submission entitled "Cyclin D1 gene and protein expression in ependymomas: correlation with tumor location, tumor grade, patient age and relapse" has been assigned the following manuscript number: N-O-D-14-00186.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://n-o.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elizabeth Martinson, Ph.D.
Managing Editor
Neuro-Oncology

Apêndice 3

Neuro-Oncology

Cyclin D1 gene and protein expression in ependymomas: correlation with tumor location, tumor grade, patient age and relapse --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Cyclin D1 gene and protein expression in ependymomas: correlation with tumor location, tumor grade, patient age and relapse
Article Type:	Basic and Translational Investigations
Keywords:	Ependymoma; Glioma; Cyclin D1; Gene expression; Immunohistochemical markers
Corresponding Author:	Fernanda Andrade, M.D. University of Sao Paulo, School of Medicine Sao Paulo, Sao Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Sao Paulo, School of Medicine
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Fernanda Andrade, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Fernanda Andrade, M.D. Suely Kazue Nagahashi Marie, M.D., PhD Miyuki Uno, PhD Hamilton Matsushita, M.D., PhD Mario Augusto Taricco, M.D., PhD Manoel Jacobsen Teixeira, M.D., PhD Sergio Rosemberg, M.D., PhD Sueli Mieko Oba-Shinjo, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>Background: Ependymomas are rare tumors of the CNS. Although cyclin D1 overexpression has been related to several cancers, its prognostic value in ependymomas has not yet been fully established.</p> <p>Methods: We initially evaluated cyclin D1 gene (CCND1) expression in 33 cases of ependymoma by RT-qPCR, followed by an immunohistochemical analysis of cyclin D1 expression in 149 samples of ependymomas corresponding to 121 patients. Eighty-one patients were adults (mean age 27.2 years) and there were 60 intracranial cases. Ten tumors were myxopapillary, 92 were grade II, and 19 were grade III. Gross total resection (GTR) was achieved in 62% of cases, and relapse was confirmed in 41.4% of cases. Cyclin D1 protein expression was analyzed semi-quantitatively by immunohistochemistry and scored with a labeling index (LI) calculated as the percentage of positively stained nuclei by intensity.</p> <p>Results: There was a correlation between the mRNA and protein expression levels ($p < 0.0001$). Higher CCND1 expression levels were observed in anaplastic ($p = 0.002$) and supratentorial cases ($p = 0.008$), and these correlations were confirmed in protein analyses ($p < 0.0001$ for both parameters). Additionally, correlations between the cyclin D1 LI score and age ($p = 0.001$) were observed. A stratified analysis demonstrated that cyclin D1 expression was strong in tumors with a supratentorial location, independent of the histological grade or age. Relapse was more frequent in cases with a higher cyclin D1 LI score ($p = 0.046$), and correlation with progression-free survival was observed in cases with GTR ($p = 0.001$).</p> <p>Conclusion: The cyclin D1 LI could be used to guide treatment in supratentorial cases with GTR.</p>
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:

School of Medicine of University of São Paulo

April 3rd, 2014

Professor Patrick Wen
Editor-in-Chief
Neuro-Oncology

Dear Professor Patrick Wen,

Please find enclosed our manuscript entitled “Cyclin D1 gene and protein expression in ependymomas: correlation with tumor location, tumor grade, patient age and relapse” for your consideration to be published in Neuro-Oncology as a Basic and Translational Investigation article

We performed an expression analysis of the cyclin D1 gene and protein in a group of 121 patients of all ages with intracranial and intramedullary ependymoma. Cyclin D1 high expression was observed in tumors of supratentorial location. Additionally, relapses and a shorter progression-free survival were more frequent in cases with higher cyclin D1 expression, even in cases with gross total resection. Therefore, cyclin D1 expression might be a useful tool, beyond the morphological grade diagnosis, to guide follow-up and eventually targeted therapy in patients with supratentorial ependymomas.

We are looking forward to hearing the comments of the editorial board of this journal and its acceptance for publication. Thank you very much for the attention of this matter.

Sincerely yours,

Division of Neurosurgery, Department of Neurology
School of Medicine of University of São Paulo
São Paulo – Brazil

Cyclin D1 gene and protein expression in ependymomas: correlation with tumor location, tumor grade, patient age and relapse

Authors:

Fernanda Andrade, Suely Kazue Nagahashi Marie, Miyuki Uno, Hamilton Matushita, Mario Augusto Taricco, Manoel Jacobsen Teixeira, Sergio Rosemberg, and Sueli Mieko Oba-Shinjo

Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo; Av. Dr. Arnaldo, 455, 4th floor, room 4110, Cerqueira Cesar – CEP 01246-903, Sao Paulo/SP, Brazil (F.A., S.K.N.M., M.U., S.M.O.S.); Division of Neurosurgery, Department of Neurology and Neurosurgery (F.A., H.M., M.A.T., M.J.T.), Department of Pathology (S.R.), Hospital das Clinicas, School of Medicine, University of Sao Paulo; Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 5th floor, room 5084, Cerqueira Cesar – CEP 05403-000, Sao Paulo/SP, Brazil (F.A., H.M., M.A.T., M.J.T., S.R.); Center for Studies of Cellular and Molecular Therapy (NETCEM) University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil (S.K.N.M.)

Running title: Cyclin D1 expression in ependymomas

Corresponding author: Fernanda Andrade, MD; Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo; Av.

Dr. Arnaldo, 455, 4th floor, room 4110, Cerqueira Cesar – CEP 01246-903, Sao Paulo/SP, Brazil; tel: (+55)11-3061-8559; email: fandrade87@usp.br

Funding: This work was supported by grant from São Paulo Research Foundation (FAPESP) (12/15128-0).

Conflict of interest statement: none declared

Abstract

Background: Ependymomas are rare tumors of the CNS. Although cyclin D1 overexpression has been related to several cancers, its prognostic value in ependymomas has not yet been fully established.

Methods: We initially evaluated cyclin D1 gene (*CCND1*) expression in 33 cases of ependymoma by RT-qPCR, followed by an immunohistochemical analysis of cyclin D1 expression in 149 samples of ependymomas corresponding to 121 patients. Eighty-one patients were adults (mean age 27.2 years) and there were 60 intracranial cases. Ten tumors were myxopapillary, 92 were grade II, and 19 were grade III. Gross total resection (GTR) was achieved in 62% of cases, and relapse was confirmed in 41.4% of cases. Cyclin D1 protein expression was analyzed semi-quantitatively by immunohistochemistry and scored with a labeling index (LI) calculated as the percentage of positively stained nuclei by intensity.

Results: There was a correlation between the mRNA and protein expression levels ($p < 0.0001$). Higher *CCND1* expression levels were observed in anaplastic ($p = 0.002$) and supratentorial cases ($p = 0.008$), and these correlations were confirmed in protein analyses ($p < 0.0001$ for both parameters). Additionally, correlations between the cyclin D1 LI score and age ($p = 0.001$) were observed. A stratified analysis demonstrated that cyclin D1 expression was strong in tumors with a supratentorial location, independent of the histological grade or age. Relapse was more frequent in cases with a higher cyclin D1 LI score ($p = 0.046$), and correlation with progression-free survival was observed in cases with GTR ($p = 0.001$).

Conclusion: The cyclin D1 LI could be used to guide treatment in supratentorial cases with GTR.

Keywords

Ependymoma, Glioma, Cyclin D1, Gene expression, Immunohistochemical markers.

Introduction

Ependymomas are rare tumors of neuroectodermal origin arising from ependymal cells that can be present within either intracranial or spinal regions.¹⁻³ These tumors constitute approximately 3-9% of all primary tumors of the central nervous system (CNS).^{4,5} Ependymoma is the third most common brain tumor in children^{6,7} but is rare in adults, occurring most commonly in the spinal cord at this life stage.^{8,9}

Ependymomas are classified as grade I (subependymomas and myxopapillary ependymomas), grade II (classical ependymomas) and grade III (anaplastic ependymomas), according to the World Health Organization (WHO).¹⁰ Treatment includes maximal surgical resection and, in the majority of cases, adjuvant radiotherapy; nevertheless, treatment fails to cure 20-30% of patients.¹¹⁻¹³ Studies have demonstrated that ependymal tumors might be heterogeneous, and clinical variables such as age, tumor location, histological grade and grade of resection are not sufficient to accurately identify disease risk.^{1,11,14} During the last decade, researchers have focused their efforts on evaluating chromosomal alterations, gene expression and molecular pathways in attempts to subgroup ependymomas according to their biological profiles and to identify potential prognostic markers and therapeutic targets.^{2,15-22}

Cyclin D1, an important regulator of G1 to S phase progression in many different cell types, acts as a mitogenic signal sensor.²³⁻²⁵ Pathways such as PIK3/AKT, Wnt/ β -catenin and Notch and tumor suppressor proteins such as p16 strictly regulate the rates of cyclin D1 production, degradation and suppression.²⁶⁻³⁰ Cyclin D1 overexpression has been linked to the development and progression of several cancers, including lymphoma, carcinoma of the breast and high-grade gliomas.^{23,25,31,32} The new chemotherapy agents

developed include pan-cyclin-dependent kinase inhibitors and highly specific cyclin D1/CDK4/CDK6 inhibitors in addition to Erb-targeting agents, GSK-3 β regulators (curcumin) and Notch pathway inhibitors (inhibitor of γ -secretase).^{23,29,33-37} Classical immunohistochemical markers such as ki-67, p53, EGFR and cyclin D1 have been analyzed in ependymomas, though the prognostic value of increased cyclin D1 expression has not yet been fully established.^{4,16,38-41}

We performed an expression analysis of the cyclin D1 gene (*CCND1*) and cyclin D1 protein in a group of 121 patients of all ages with intracranial and intramedullary ependymoma. Gene and protein expression data were correlated with clinical data.

Materials and Methods

Patient Population

A cohort of 121 cases included in this study was retrieved from patients with ependymoma resection in the period from 1996 to 2011. Thirty-three fresh-frozen samples and 149 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples were available. Clinical data of age, tumor location, histological grade, grade of resection, relapse, progression-free survival (PFS), death and overall survival (OS) were collected retrospective and prospectively (Table 1). Surgical descriptions or post-operative images were used to access the grade of resection, which was not feasible for 13 cases. Patient outcomes were accessed by chart analysis or telephonic contact; for 22 cases, the follow-up was performed in the referring hospitals. The clinical data of these patients collected until 2007 has already been published.⁴² The follow-up time was considered as the last

outpatient visit, death or last revision on October/2013. This study has the approval of the ethical committee of Hospital das Clinicas, School of Medicine of University of Sao Paulo (#1320/09).

Fresh Frozen Tissue and Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR)

Thirty-three fresh frozen tissue samples of ependymomas were obtained during therapeutic surgery of patients treated by the Neurosurgery Group of the Department of Neurology, Hospital das Clinicas, School of Medicine of University of Sao Paulo, during the period of 2000 to 2011. Total RNA was extracted from the frozen tissues using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A conventional reverse transcription reaction was performed to yield single-stranded cDNA. First-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA previously treated with 1 unit of DNase I (FPLC-pure, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using random and oligo(dT) primers, RNase inhibitor and SuperScript III reverse transcriptase according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The resulting cDNA was subsequently treated with 1 unit of RNase H (GE Healthcare), diluted with TE buffer and stored at -20°C until later use.

The expression level of *CCND1* was analyzed by RT-qPCR using the SYBR Green approach. Quantitative data were normalized in relation to the geometric mean of three reference genes, hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*), glucuronidase beta (*GUSB*) and TATA box binding protein (*TBP*), as previously demonstrated.⁴³ The primers designed to amplify 80-120-bp amplicons and with a melting temperature of 60°C were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). The

sequences (5'-3') are as follows: *CCND1* F, GGCGGAGGAGAACAAACAGA, *CCND1* R, GGGCGGATTGGAAATGAACT; *HPRT* F, TGAGGATTTGGAAAGGGTGT, *HPRT* R, GAGCACACAGAGGGCTACAA; *GUSB* F, GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT, *GUSB* R, CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA; *TBP* F, AGGATAAGAGAGCCACGAACCA, *TBP* R, CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT. The primer concentrations used were 200 nM for *HPRT*, *TBP* and *CCND1* and 400 nM for *GUSB*. The PCR amplification mixtures (12 µl) contained 3 µl of cDNA, 6 µl of 2X Power Sybr Green I Master Mix (Life Technologies) and forward and reverse primers. The PCR reactions were performed using an ABI Prism 7500 sequence detector (Life Technologies). All the reactions were performed in duplicate. The following equation was applied to calculate gene expression according to primer efficiency (E) in the tumor samples: $2^{-\Delta Ct}$, where $\Delta Ct = Ct_{CCND1} -$ the geometric mean Ct of the reference gene.⁴⁴ For the statistical analysis, the data were compared according to age at diagnosis (children and adults, under and over 18 years old, respectively), tumor location (intramedullary vs intracranial comprising infratentorial and supratentorial), histological grade, relapse and death.

Pathological and Immunohistochemical Analyses

All ependymoma cases were reviewed by a neuropathologist (S.R.) to confirm the diagnosis and histological grade according to the WHO classification and to select representative areas for tissue microarray (TMA) construction. Cases classified as subependymoma (grade I ependymoma) and ependymoblastoma (primitive neuroectodermal tumor) were excluded.

For each case, two cores of 2-mm diameter were sampled to construct a TMA using formalin-fixed, paraffin-embedded blocks. The exceptions were myxopapillary cases, which were analyzed as entire slide sections because of its peculiar morphology with a mucoid matrix. For immunohistochemical detection, TMA sections (4 μ m) were processed by the EnVision FLEX detection system following the manufacturer's recommendations (Dako, Carpinteria, CA, USA). Briefly, the sections were immersed in citrate buffer (pH 6.0) and deparaffinized at 65°C for 20 min, followed by antigenic retrieval at 97°C for 20 min using PTLINK (Dako) equipment. Endogenous peroxidase was blocked with the EnVision Flex Peroxidase Block reagent prior to incubation with the antibody FLEX monoclonal rabbit anti-cyclin D1, clone EP12 (1:2; Dako, ready to use), for 16 hours at room temperature. Antigen-antibody complexes were detected with EnVision Flex/HRP and EnVision Flex Substrate Working Solution – DAB. Nuclei were counterstained with Meyer hematoxylin. The tissue sections were dehydrated and cleared, and a cover slip was placed over the sample.

TMA sections were scanned using a 3DHISTECH scanner (Budapest, Hungary) and scored blindly to any patient data using Pannoramic Viewer software (3DHISTECH) by two independent investigators. Cases with discordant scores were reevaluated jointly and if necessary using original TMA slides and a brightfield microscope (Nikon) until a consensus was reached. A semi-quantitative score system considering both the intensity of staining and percentage of stained cells was applied as follows: for intensity of staining, 0= negative, 1= weak, 2= moderate and 3= strong; for cell percentage, 0= no cells stained, 1= 1–25%, 2= 26–50%, 3= 51–75%, 4= 76–100% and F= focal. A cyclin D1 labeling index (LI) score was obtained by the product of the intensity of staining and

the percentage of stained cells. The final LI score for each case was the highest value obtained from duplicate cores. Digital photomicrographs of representative fields were captured and processed using Pannoramic Viewer software.

Statistical Analysis

The association between clinical and histological variables was tested using Fisher's Exact Test (2 dichotomous variables) or the Pearson Chi-square test (more than 2 variables). Relative gene expression according to the clinical variables of the patients was assessed using the Kolmogorov-Smirnov normality test and the non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests followed by the Dunn test. Correlation between gene expression and the protein score was analyzed by the Spearman test. Disease outcomes were analyzed in terms of overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). OS and PFS curves were estimated by means of the Kaplan–Meier method; between-group comparisons were performed using the log-rank (Mantel Cox) test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. The calculations were performed using SPSS, v. 15.0 (IBM, Armonk, USA).

Results

Clinical Data Analysis

There were no significant differences in the patient's clinical data and tumor characteristics between the series of ependymomas analyzed by IHC and the subgroups analyzed at the RNA level. Table 1 shows demographic data of the 121 patients included

in this study. Patient age ranged from 6 months to 85 years, with a mean of 27.2 years. Eighty-one (66.9%) patients were adults (over 18 years), and most of the tumors (57 out of 81) were intramedullary in location. Ninety percent of the pediatric cases (36 out of 40) presented intracranial tumors. Grade II ependymomas corresponded to 76% (92 out of 121) of cases, and 43 among them were intramedullary adult cases. Conversely, most of the anaplastic cases were intracranial (14 out of 19). Gross total resection (GTR) was achieved in 62% of patients. No correlations between grade of resection and age ($p=0.29$), tumor location ($p=0.148$) or histological grade ($p=0.48$) were observed.

The mean follow-up time was 57 months. Relapse occurred in 41.4% cases, and the mean PFS was 108.8 months; 63.4% of the relapses occurred prior to 24 months after surgery, with only two cases after five years of follow-up, one myxopapillary and the other supratentorial. A PFS analysis according to Kaplan–Meier curves and a log-rank test showed a shorter time to relapse in children (Fig. 1A; $p<0.0001$), an intracranial, supratentorial location (Fig. 1B; $p<0.0001$), anaplastic histology (Fig. 1C; $p=0.011$) and incomplete resection (Fig. 1D; $p=0.004$) (Table 2). The mean OS was 169.9 months. Nineteen patients died; the deaths were correlated to an intracranial tumor location (both supratentorial and posterior fossa; $p=0.009$), incomplete resection ($p=0.008$) and relapse ($p=0.0002$) according to the log-rank test (Table 2).

Cyclin D1 Analysis at the mRNA Level

CCND1 expression analyzed by RT-qPCR showed higher median expression levels with an anaplastic histology (Table 3; $p=0.001$, Mann-Whitney test GII vs GIII). The median *CCND1* expression levels was higher in cases with an intracranial versus an

intramedullary location ($p=0.060$ Mann-Whitney test). The stratification of intracranial cases into supratentorial and infratentorial locations demonstrated that the *CCND1* expression level was higher among the supratentorial cases (Table 3; $p=0.008$, Kruskal-Wallis test; Dunn test: $p=0.004$ for intramedullary *vs* supratentorial sites, $p=0.018$ for supratentorial *vs* infratentorial sites). No correlations were observed between *CCND1* expression levels with gender, age, grade of resection or relapse.

Cyclin D1 Analysis at the Protein Level

An immunohistochemistry analysis in an expanded series of ependymomas was performed to validate the results of *CCND1* mRNA expression at the protein level. Cyclin D1 nuclear localization was considered negative in 12.9% (LI=0), focal in 17.0% (LI= 1), weak in 23.1% (LI= 2 or 3), moderate in 19.8% (LI= 4 or 6) and strong in 27.2% (LI= 9 or 12) (Fig. 2). All the myxopapillary cases were negative for cyclin D1 staining, whereas a cyclin LI score of 12 was observed only in supratentorial cases. When the mRNA and protein expression data of the 33 cases were compared, a moderate correlation was observed (Fig. 3; $p<0.0001$ and $r=0.67$, Spearman correlation).

Interestingly, the cyclin D1 LI score confirmed higher expression in the intracranial cases than in the intramedullary cases (Fig. 4A; $p<0.0001$) and in anaplastic cases than in lower grade cases (Fig. 4B; $p<0.0001$). Additionally, we also observed higher cyclin D1 expression in the pediatric than in adult cases (Fig. 4C; $p=0.001$) (Pearson Chi-square test). A stratified analysis demonstrated that the highest cyclin D1 LI score in intracranial cases was for a supratentorial tumor site (Fig. 4D), and this finding

was independent of either the grade of malignancy (Fig. 4E) or the age of the patient (Fig. 4F).

Relapses were more frequent in cases with higher cyclin D1 LI scores (Fig. 5A; Pearson Chi-square test $p=0.046$). When cases with higher cyclin D1 scores (LI = 9 and 12) were compared to cases with lower scores (LI = 2 to 6), a significant difference in PFS was detected (Fig. 5B; $p=0.009$). As the grade of resection directly impacts relapse and PFS, the variation in cyclin D1 LI score was analyzed according to this parameter (Fig. 5C). Interestingly, cases with GTR evolving to relapse with a shorter PFS presented higher cyclin D1 LI scores (Fig. 5D; $p=0.001$). The end-point of death and overall survival time had no correlation with any cyclin D1 LI score.

Discussion

Ependymomas are rare tumors that exhibit different behaviors depending on the tumor site, age at diagnosis and histology. Nonetheless, all of these potential prognostic factors are biologically and clinically interrelated, contributing to the difficulty in defining which factor has the strongest influence on the clinical outcome of patients with ependymoma.¹³ Our study confirmed that age and tumor location might influence the PFS time, as reported by others.^{6,8,9,13,45} The histological grade of ependymomas and its biological relevance in outcomes are controversial.⁴⁶⁻⁵⁰ In our series, an anaplastic histology was more frequent among children and for an intracranial location, and both parameters were related to tumor relapse and a shorter PFS.

The search for biomarkers to better predict the clinical evolution of patients with ependymoma has been undertaken by many authors.^{20,22,41,51-58} Most studies have revealed different genetic expression profiles depending on the tumor location and patient's age.^{2,16,17,19,21,59-61} Nevertheless, no biomolecular or IHC marker to date has showed sufficient evidence or correlation with clinical variables to be introduced in clinical practice.⁶²

Cyclin D1 is an important regulator of the cell cycle because it phosphorylates and inactivates the retinoblastoma protein (Rb), promoting progression through the G1-S phase of the cell cycle.^{24,63} Cyclin D1 is a key sensor and integrator of extracellular cell signaling,^{25,36,63} and its expression is regulated in a cell-specific manner by growth factors such as EGF, IGF-1 and IGF-2, amino acids, lysophosphatidic acid, hormones including androgens, retinoic acid, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ ligand, secreted factors from adipocytes and gastrointestinal hormones.²⁴ The increased expression of cyclin D1 may play a critical role in tumor development and in maintenance of the malignant phenotype, but cyclin D1 overexpression *per se* has been reported as not being sufficient to drive neoplastic transformation.^{23,25,30,31} This overexpression in human tumors is driven by multiple mechanisms comprising genomic alterations, post-transcriptional regulation and post-translational protein stabilization.²⁵ Many oncogenic signals induce cyclin D1 expression, including Ras, Src, ErbB2, β -catenin in Wnt signaling, Notch1, signal transducer and activators of transcription (STATs) and simian virus 40 (SV40) small-t antigen.^{24,27,29,30,64} Cyclin D1 overexpression also may enhance tumor growth and progression by potentiating the stimulatory sign of bFGF.²³ Another effect of high cyclin D1 expression is the resistance

of tumor cells to chemotherapeutic agents such as cisplatin by the down-regulation of apoptotic mechanisms.^{23,37,63} Deregulated cyclin D1 and cyclin-dependent kinase (CDKs) degradation are other reported mechanisms responsible for the increased levels of cyclin D1 in several type of cancers.^{33,36} The mechanisms involved in the regulation of cyclin D1 stability and therapeutic agents to induce cyclin D1 and CDK degradation have been studied.^{32,34,35,64} These agents and inhibitors of receptor tyrosine kinase (RTK) may be useful for the treatment of cancers associated with cyclin D1 overexpression.^{25,26,32-36,64}

Cyclin D1 overexpression has been described as a driving feature in various types of cancer, including mantle cell lymphoma (MCL), non-small cell lung cancer, carcinomas of breast, head and neck including parathyroid adenomas, esophagus and colon tumors and high-grade gliomas.^{23,25-29,63} There are previous studies of cyclin D1 in ependymomas using molecular or IHC approaches.^{4,16,17,21,38-41,65} Four studies based on oligonucleotide microarray methodology identified *CCND1* as one of the genes with high expression that correlated with an anaplastic histology,^{17,65} a supratentorial location¹⁶ and a pediatric population.²¹ Additionally, another four studies addressing cyclin D1 expression by immunohistochemistry described that its overexpression was correlated to a supratentorial localization,⁴⁰ an anaplastic histology,³⁸ a shorter PFS^{4,39} and a higher risk of death.⁴ In our study, high cyclin D1 expression levels were observed in supratentorial tumors and those with an anaplastic histology, with regard to both mRNA and protein expression. Additionally, pediatric cases showed higher cyclin D1 expression at the protein level when compared to adult cases. Of note, the overexpression of cyclin D1 observed in supratentorial tumors was independent of the histological grade and age of the patient. In spite of the grade of resection being an independent prognostic factor in

ependymoma^{6,8,11-13,51}, as confirmed in our cases, cyclin D1 overexpression was associated with relapse and a shorter PFS time among cases with GTR, though such correlations were not observed among patients with STR.

Although there are few reports describing genomic alterations at the cyclin D1 locus (chromosome 11q13) in ependymomas,^{66,67} chromosomal translocation is a common genetic mechanism in lymphoma, and *CCND1* amplifications have also been observed in a number of cancers.²⁵ However, deletion and methylation of the tumor suppressor *CDKN2A* is commonly described in supratentorial or anaplastic ependymomas^{2,15,16,51,58,60,65,66,68-71}. *CDKN2A* acts by inhibiting the binding of the CDK4 protein to cyclin D1, thus preventing phosphorylation of the Rb protein.⁷² *CDKN2A* also blocks the MDM2-induced degradation of p53, enhancing p53-dependent transactivation and apoptosis.^{23,26,34} Cyclin D1 overexpression may also be a consequence of Notch pathway alteration, which has been described in ependymomas with a supratentorial location,^{16,17,21,60} and may influence cell fate in the developing nervous system and regulate stem cell self-renewal in both nonneoplastic neural tissue and embryonal brain tumors.^{16,73-78} The regulation of cyclin D1 expression level, as well as CDK inhibitors through the Notch pathway, has previously been described, as has the regulation of the G1/S cell cycle transition.^{27-29,79,80} In fact, *in vitro* and *in vivo* assays of Notch blockade via pharmacologic inhibitors of γ -secretase (GSI) have suppressed the downstream target Hes1, causing cell cycle exit and apoptosis in brain tumors and other systemic tumors.^{27,29,75,76,81} Furthermore, a reciprocal regulation of Notch and PI3K/AKT signaling occurs and plays a critical role in cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis in many human cancers.^{29,82,83} Recently, PI3K pathway activation and high cyclin D1

expression were described for a supratentorial location.⁴⁰ This pathway can induce cyclin D1 production by NF κ B phosphorylation and can reduce cyclin D1 degradation by GSK3 β inactivation.^{25,33,34,36,82,84} Therefore, inhibitors that target key nodes in the PI3K signaling pathway currently in clinical trials may also potentially be used for ependymoma patients, mainly those presenting cyclin D1 overexpression in a supratentorial site.^{82,85,86}

In conclusion, we demonstrated that cyclin D1 overexpression was predominant in supratentorial ependymomas. Considering that this feature was associated with a higher risk of relapse and a shorter PFS, even with GTR and malignancy grade II, close clinical follow-up should be recommended in this subset of ependymomas. Although more studies are required to elucidate the mechanisms of cyclin D1 overexpression in supratentorial ependymomas, cyclin D1 expression proved to be a useful tool, beyond the morphological WHO grade diagnosis, to guide follow-up and eventually targeted therapy in this subset of ependymomas.

Funding

This work was supported by grant from São Paulo Research Foundation (FAPESP) (12/15128-0).

Acknowledgements

We thank National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Fundação Faculdade de Medicina (FFM) for financial support for S.K.N.M. and S.M.O.S.

References

1. Reni M, Gatta G, Mazza E, Vecht C. Ependymoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. Jul 2007;63(1):81-89.
2. Nagasawa DT, Trang A, Choy W, et al. Genetic expression profiles of adult and pediatric ependymomas: molecular pathways, prognostic indicators, and therapeutic targets. *Clin Neurol Neurosurg*. Apr 2013;115(4):388-399.
3. Lehman NL. Central nervous system tumors with ependymal features: a broadened spectrum of primarily ependymal differentiation? *J Neuropathol Exp Neurol*. Mar 2008;67(3):177-188.
4. Zawrocki A, Izycka-Swieszewska E, Papierz W, Liberski PP, Zakrzewski K, Biernat W. Analysis of the prognostic significance of selected morphological and immunohistochemical markers in ependymomas, with literature review. *Folia Neuropathol*. 2011;49(2):94-102.
5. McGuire CS, Sainani KL, Fisher PG. Incidence patterns for ependymoma: a surveillance, epidemiology, and end results study. *J Neurosurg*. Apr 2009;110(4):725-729.
6. Cage TA, Clark AJ, Aranda D, et al. A systematic review of treatment outcomes in pediatric patients with intracranial ependymomas. *J Neurosurg Pediatr*. Jun 2013;11(6):673-81.
7. Boop FA, Sgouros S. Intracranial ependymoma in children: current status and future trends on diagnosis and management. *Childs Nerv Syst*. Oct 2009;25(10):1163-1165.

8. Gilbert MR, Ruda R, Soffietti R. Ependymomas in adults. *Curr Neurol Neurosci Rep.* May 2010;10(3):240-247.
9. Schwartz TH, McCormick PC. Intramedullary ependymomas: clinical presentation, surgical treatment strategies and prognosis. *J Neurooncol.* May 2000;47(3):211-218.
10. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* Aug 2007;114(2):97-109.
11. Wright KD, Gajjar A. Current Treatment Options for Pediatric and Adult Patients With Ependymoma. *Curr Treat Options Oncol.* J Dec 2012;13(4):465-77.
12. Zacharoulis S, Moreno L. Ependymoma: an update. *J Child Neurol.* Nov 2009;24(11):1431-1438.
13. Amirian ES, Armstrong TS, Aldape KD, Gilbert MR, Scheurer ME. Predictors of Survival among Pediatric and Adult Ependymoma Cases: A Study Using Surveillance, Epidemiology, and End Results Data from 1973 to 2007. *Neuroepidemiology.* 2012;39(2):116-124.
14. Bouffet E, Perilongo G, Canete A, Massimino M. Intracranial ependymomas in children: a critical review of prognostic factors and a plea for cooperation. *Med Pediatr Oncol.* Jun 1998;30(6):319-329; discussion 329-331.
15. Witt H, Korshunov A, Pfister SM, Milde T. Molecular approaches to ependymoma: the next step(s). *Curr Opin Neurol.* Dec 2012;25(6):745-50.
16. Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, et al. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell.* Oct 2005;8(4):323-335.

17. Palm T, Figarella-Branger D, Chapon F, et al. Expression profiling of ependymomas unravels localization and tumor grade-specific tumorigenesis. *Cancer*. Sep 2009;115(17):3955-3968.
18. Atkinson JM, Shelat AA, Carcaboso AM, et al. An integrated in vitro and in vivo high-throughput screen identifies treatment leads for ependymoma. *Cancer Cell*. Sep 2011;20(3):384-399.
19. Witt H, Mack SC, Ryzhova M, et al. Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma. *Cancer Cell*. Aug 2011;20(2):143-157.
20. Mendrzyk F, Korshunov A, Benner A, et al. Identification of gains on 1q and epidermal growth factor receptor overexpression as independent prognostic markers in intracranial ependymoma. *Clin Cancer Res*. Apr 2006;12(7 Pt 1):2070-2079.
21. Modena P, Lualdi E, Facchinetti F, et al. Identification of tumor-specific molecular signatures in intracranial ependymoma and association with clinical characteristics. *J Clin Oncol*. Nov 2006;24(33):5223-5233.
22. Gilbertson RJ, Bentley L, Hernan R, et al. ERBB receptor signaling promotes ependymoma cell proliferation and represents a potential novel therapeutic target for this disease. *Clin Cancer Res*. Oct 2002;8(10):3054-3064.
23. Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci*. May 2007;98(5):629-635.
24. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. Dec 2004;145(12):5439-5447.

25. Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol.* Aug 2009;220(2):292-296.
26. Liu W, Lv G, Li Y, Li L, Wang B. Downregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in malignant gliomas. *J Exp Clin Cancer Res.* Aug 2011;30:76.
27. Naganuma S, Whelan KA, Natsuizaka M, et al. Notch receptor inhibition reveals the importance of cyclin D1 and Wnt signaling in invasive esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res.* Jun 2012;2(4):459-475.
28. Cohen B, Shimizu M, Izrailit J, et al. Cyclin D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* Aug 2010;123(1):113-124.
29. Guo D, Ye J, Dai J, et al. Notch-1 regulates Akt signaling pathway and the expression of cell cycle regulatory proteins cyclin D1, CDK2 and p21 in T-ALL cell lines. *Leuk Res.* May 2009;33(5):678-685.
30. Wang C, Lisanti MP, Liao DJ. Reviewing once more the c-myc and Ras collaboration: converging at the cyclin D1-CDK4 complex and challenging basic concepts of cancer biology. *Cell Cycle.* Jan 2011;10(1):57-67.
31. Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol.* Jul 2013;183(1):3-9.
32. Casimiro MC, Velasco-Velazquez M, Aguirre-Alvarado C, Pestell RG. Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present. *Expert Opin Investig Drugs.* Mar 2014;23(3):295-304.
33. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer.* Apr 2007;6:24.

34. Freemantle SJ, Liu X, Feng Q, et al. Cyclin degradation for cancer therapy and chemoprevention. *J Cell Biochem*. Nov 2007;102(4):869-877.
35. Shan J, Zhao W, Gu W. Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation. *Mol Cell*. Nov 2009;36(3):469-476.
36. Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. GSK-3beta regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy. *Cell Signal*. Apr 2008;20(4):581-589.
37. Biliran H, Jr., Wang Y, Banerjee S, et al. Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line. *Clin Cancer Res*. Aug 2005;11(16):6075-6086.
38. Prayson RA. Cyclin D1 and MIB-1 immunohistochemistry in ependymomas: a study of 41 cases. *Am J Clin Pathol*. Nov 1998;110(5):629-634.
39. Zamecnik J, Snuderl M, Eckschlager T, et al. Pediatric intracranial ependymomas: prognostic relevance of histological, immunohistochemical, and flow cytometric factors. *Mod Pathol*. Oct 2003;16(10):980-991.
40. Rogers HA, Mayne C, Chapman RJ, Kilday JP, Coyle B, Grundy RG. PI3K pathway activation provides a novel therapeutic target for pediatric ependymoma and is an independent marker of progression free survival. *Clin Cancer Res*. Dec 2013;19(23):6450-60.
41. Kuncova K, Janda A, Kasal P, Zamecnik J. Immunohistochemical prognostic markers in intracranial ependymomas: systematic review and meta-analysis. *Pathol Oncol Res*. Dec 2009;15(4):605-614.

42. Andrade FG, de Aguiar PH, Matushita H, et al. Intracranial and spinal ependymoma: series at Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo. *Arq Neuropsiquiatr*. Sep 2009;67(3A):626-632.
43. Valente V, Teixeira SA, Neder L, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol*. Mar 2009;10:17.
44. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-1108.
45. Benesch M, Frappaz D, Massimino M. Spinal cord ependymomas in children and adolescents. *Childs Nerv Syst*. Dec 2012;28(12):2017-2028.
46. Godfraind C. Classification and controversies in pathology of ependymomas. *Childs Nerv Syst*. Oct 2009;25(10):1185-1193.
47. Raghunathan A, Wani K, Armstrong TS, et al. Histological predictors of outcome in ependymoma are dependent on anatomic site within the central nervous system. *Brain Pathol*. Sep 2013;23(5):584-94.
48. Ellison DW, Kocak M, Figarella-Branger D, et al. Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts. *J Negat Results Biomed*. May 2011;10:7.
49. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, Timirgaz V. The histologic grade is a main prognostic factor for patients with intracranial ependymomas treated in the microneurosurgical era: an analysis of 258 patients. *Cancer*. Mar 2004;100(6):1230-1237.

50. Tihan T, Zhou T, Holmes E, Burger PC, Ozuysal S, Rushing EJ. 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.* Feb 2008;21(2):165-177.
51. Modena P, Buttarelli FR, Miceli R, et al. Predictors of outcome in an AIEOP series of childhood ependymomas: a multifactorial analysis. *Neuro Oncol.* Nov 2012;14(11):1346-1356.
52. Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V. Immunohistochemical markers for prognosis of ependymal neoplasms. *J Neurooncol.* Jul 2002;58(3):255-270.
53. Milde T, Hielscher T, Witt H, et al. Nestin Expression Identifies Ependymoma Patients with Poor Outcome. *Brain Pathol.* Nov 2012;22(6):848-860.
54. Moreno L, Popov S, Jury A, Al Sarraj S, Jones C, Zacharoulis S. Role of platelet derived growth factor receptor (PDGFR) over-expression and angiogenesis in ependymoma. *J Neurooncol.* Jan 2013;111(2):169-176.
55. Preusser M, Wolfsberger S, Czech T, Slavic I, Budka H, Hainfellner JA. Survivin expression in intracranial ependymomas and its correlation with tumor cell proliferation and patient outcome. *Am J Clin Pathol.* Oct 2005;124(4):543-549.
56. Ridley L, Rahman R, Brundler MA, et al. Multifactorial analysis of predictors of outcome in pediatric intracranial ependymoma. *Neuro Oncol.* Oct 2008;10(5):675-689.
57. Tabori U, Wong V, Ma J, et al. Telomere maintenance and dysfunction predict recurrence in paediatric ependymoma. *Br J Cancer.* Oct 2008;99(7):1129-1135.
58. Korshunov A, Witt H, Hielscher T, et al. Molecular staging of intracranial ependymoma in children and adults. *J Clin Oncol.* Jul 2010;28(19):3182-3190.

-
59. Andreiuolo F, Puget S, Peyre M, et al. Neuronal differentiation distinguishes supratentorial and infratentorial childhood ependymomas. *Neuro Oncol.* Nov 2010;12(11):1126-1134.
60. Johnson RA, Wright KD, Poppleton H, et al. Cross-species genomics matches driver mutations and cell compartments to model ependymoma. *Nature.* Jul 2010;466(7306):632-636.
61. Hirose Y, Aldape K, Bollen A, et al. Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups. *Am J Pathol.* Mar 2001;158(3):1137-1143.
62. Andreiuolo F, Ferreira C, Puget S, Grill J. Current and evolving knowledge of prognostic factors for pediatric ependymomas. *Future Oncol.* Feb 2013;9(2):183-191.
63. Wang J, Wang Q, Cui Y, et al. Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells. *J Neurooncol.* Feb 2012;106(3):473-484.
64. Fleming IN, Hogben M, Frame S, McClue SJ, Green SR. Synergistic inhibition of ErbB signaling by combined treatment with seliciclib and ErbB-targeting agents. *Clin Cancer Res.* Jul 2008;14(13):4326-4335.
65. Korshunov A, Neben K, Wrobel G, et al. Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade, and patient age. *Am J Pathol.* Nov 2003;163(5):1721-1727.
66. Yao Y, Mack SC, Taylor MD. Molecular genetics of ependymoma. *Chin J Cancer.* Oct 2011;30(10):669-681.

67. Kilday JP, Rahman R, Dyer S, et al. Pediatric ependymoma: biological perspectives. *Mol Cancer Res.* Jun 2009;7(6):765-786.
68. Kim JH, Huang Y, Griffin AS, Rajappa P, Greenfield JP. Ependymoma in children: molecular considerations and therapeutic insights. *Clin Transl Oncol.* Oct 2013;15(10):759-65.
69. Godfraind C, Kaczmarska JM, Kocak M, et al. Distinct disease-risk groups in pediatric supratentorial and posterior fossa ependymomas. *Acta Neuropathol.* Aug 2012;124(2):247-257.
70. Huang B, Starostik P, Schraut H, Krauss J, Sorensen N, Roggendorf W. Human ependymomas reveal frequent deletions on chromosomes 6 and 9. *Acta Neuropathol.* Oct 2003;106(4):357-362.
71. Rousseau E, Ruchoux MM, Scaravilli F, et al. CDKN2A, CDKN2B and p14ARF are frequently and differentially methylated in ependymal tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol.* Dec 2003;29(6):574-583.
72. Gadd M, Pisc C, Branda J, et al. Regulation of cyclin D1 and p16(INK4A) is critical for growth arrest during mammary involution. *Cancer Res.* Dec 2001;61(24):8811-8819.
73. Gaiano N, Fishell G. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu Rev Neurosci.* Mar 2002;25:471-490.
74. Ehm O, Goritz C, Covic M, et al. RBPJkappa-dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci.* Oct 13 2010;30(41):13794-13807.

75. Fan X, Matsui W, Khaki L, et al. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res.* Aug 2006;66(15):7445-7452.
76. Fan X, Khaki L, Zhu TS, et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells.* Jan 2010;28(1):5-16.
77. Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci.* Mar 2010;30(9):3489-3498.
78. Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H, Imayoshi I. Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. *Curr Opin Cell Biol.* Dec 2009;21(6):733-740.
79. Joshi I, Minter LM, Telfer J, et al. Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases. *Blood.* Feb 2009;113(8):1689-1698.
80. Ronchini C, Capobianco AJ. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol.* Sep 2001;21(17):5925-5934.
81. Chen J, Kesari S, Rooney C, et al. Inhibition of notch signaling blocks growth of glioblastoma cell lines and tumor neurospheres. *Genes Cancer.* Aug 2010;1(8):822-835.
82. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* Aug 2009;8(8):627-644.
83. Palomero T, Dominguez M, Ferrando AA. The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia. *Cell Cycle.* Apr 2008;7(8):965-970.

- 84.** Parker M, Mohankumar KM, Punchihewa C, et al. C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-kappaB signalling in ependymoma. *Nature*. Feb 2014;506(7489):451-5.
- 85.** Guan S, Shen R, Lafortune T, et al. Establishment and characterization of clinically relevant models of ependymoma: a true challenge for targeted therapy. *Neuro Oncol*. Jul 2011;13(7):748-758.
- 86.** Shonka NA. Targets for therapy in ependymoma. *Target Oncol*. Sep 2011;6(3):163-169.

Fig. 1. Kaplan–Meier curves representing PFS outcomes of ependymoma patients according to (A) age, (B) tumor location, (C) histological grade and (D) grade of resection. N, number of patients; y, years; GTR, gross total resection; STR, subtotal resection.

Fig. 2. Representative ependymoma cases showing IHC staining for cyclin D1 according to the tumor location and histological grade. (A) Intramedullary, grade II, LI=2. (B) Intramedullary, grade III, LI=9. (C) Supratentorial, grade II, LI=9. (D) Supratentorial, grade III, LI=12. (E) Infratentorial, grade II, LI=2. (F) Infratentorial, grade III, LI=4. Original magnification, 400x for all images.

Fig. 3. Correlation between cyclin D1 mRNA expression analyzed by RT-qPCR and protein expression evaluated by the immunohistochemistry labeling index score. Cyclin D1 immunohistochemistry labeling score: N, negative; F, focal, W, weak; M, moderate; S, strong.

Fig. 4. Cyclin D1 expression analyses according to (A and D) tumor location, (B) histological grade, (C) age of patients, (E) tumor location and histological grade, (F) tumor location and age of patients. IM, intramedullary; IC, intracranial; ST, supratentorial; PF, posterior fossa (infratentorial); y, years. Bars indicate the median in each group.

Fig. 5. Cyclin D1 expression analysis according to (A) tumor relapse, (B) tumor relapse and grade of resection, progression free survival (PFS) Kaplan Meier curves for (C) gross total resection (GTR) patients and (D) subtotal resection (STR) patients. For PFS analysis, cases were divided in two groups according to cyclin D1 expression: strong (LI values 9 and 12) and other (LI values from 2 to 6). N, number of patients.

Table 1

Table 1. Demographic data from patients analyzed in this study.

	NUMBER	%
Age		
<18y	40	33.1
>18y	81	66.9
Gender		
Female	59	48.8
Male	62	51.2
Tumor site		
Supratentorial	26	21.5
Posterior fossa	34	28.1
Intramedullary	61	50.4
Histological grade		
GI	10	8.3
GII	92	76.0
GIII	19	15.7
Grade of resection		
Complete	67	62.0
Incomplete	41	38.0
Radiotherapy		
Yes	38	34,2
No	73	65,8
Relapse		
Yes	41	41.4
No	58	58.6

Table 2

Table 2. Kaplan-Meier analysis for relapse (PFS) and death (OS) according to clinical variables.

	PFS (±SD) (months)	p*	OS (±SD) (months)	p*
Mean	108.8 (±9.1)		169.9 (±10.3)	
Age				
<18y	48.9 (±11.5)	<0.0001	142.3 (±20.4)	0.362
>18y	142.0 (±9.8)		157.5 (±7.9)	
Tumor site				
Intramedullary	146.3 (±11.2)	<0.0001	197 (±10.5)	0.009
Supratentorial	55.8 (±14.6)		127.3 (±20.8)	
Infratentorial	78.6 (±14.1)		111.3 (±13.9)	
Histological grade				
GI	130.9 (±24.8)	0.011		0.097
GII	117.3 (±10.3)		174.8 (±10.8)	
GIII	34.9 (±8.1)		83.6 (±13.1)	
Grade of resection				
GTR	132 (±11.1)	0.004	190.4 (±10.9)	0.008
STR	72.4 (±14.7)		116.0 (±15.6)	
Relapse				
Yes			142.5 (±18.8)	0.0002
No			183.9 (±3.1)	

y, years; GTR, gross total resection; STR, subtotal resection; SD, standard deviation; *log-rank

test

Table 3

Table 3. Cyclin D1 mRNA expression according to clinical variables.

	n	Median (minimum – maximum)	Mean ($\pm$ SD)	p
Total	33	24.96 (1.99 – 270.65)	49.54 ($\pm$ 61.10)	
Gender				
Female	20	22.86 (1.99 – 165.39)	37.24 ($\pm$ 39.20)	0.632*
Male	13	28.85 (3.58 – 270.65)	68.47 ($\pm$ 82.96)	
Age				
<18y	19	49.96 (2.50 – 182.85)	56.02 ($\pm$ 54.77)	0.202*
>18y	14	16.50 (1.99 – 270.65)	40.75 ($\pm$ 69.94)	
Tumor site				
Intramedullar	10	14.32 (1.99 – 58.54)	18.01 ($\pm$ 16.3)	
y				
Supratentoria	11	86.99 (4.66 – 270.65)	101.37 ($\pm$80.26)	0.008**
l				
Infratentorial	12	19.29 (2.5 – 92.65)	28.3 ($\pm$ 26.55)	
Histological grade				
GI	1	3.58		
GII	26	16.50 (1.99 – 131.55)	31.38 ($\pm$ 33.0)	0.001*
GIII	6	126.19 (50.98 – 270.65)	135.90 ($\pm$ 85.81)	
Grade of resection				
GTR	16	29.61 (3.58 – 270.65)	60.45 ($\pm$ 75.68)	0.33*
STR	12	16.50 (1.99 – 92.64)	28.0 ($\pm$ 28.43)	
Relapse				
Yes	21	49.95 (1.99 – 270.65)	63.56 ($\pm$ 68.73)	0.107*
No	8	10.40 (4.70 – 131.55)	28.25 ($\pm$ 43.03)	

n, number; y, years; SD, standard deviation; GTR, gross total resection; STR, subtotal resection; *, Mann-Whitney test; **, Kruskal-Wallis test

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)