

**Valéria Marques Figueira Muoio**

**Análise molecular dos genes *OTX1* e *OTX2* em  
meduloblastomas**

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

Programa de Neurologia  
Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue  
Nagahashi Marie

São Paulo  
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Muoio, Valéria Marques Figueira  
Análise molecular dos genes *OTX1* e *OTX2* em meduloblastomas / Valéria  
Marques Figueira Muoio. -- São Paulo, 2010.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Neurologia.  
Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.Meduloblastoma 2.Fatores de transcrição *Otx* 3.Gene *OTX1* 4.Gene  
*OTX2* 5.Sobrevida 6.Resultado de tratamento

USP/FMDBD-166/10

A meu amado pai, cuja bondade, inteligência e caráter permanecem. Posso sentir você segurando minha mão.

À minha família.  
Vivo para poder abraçá-los.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todos que tornaram possível a realização desta tese.

A Deus, por me dar força e saúde.

À minha querida família, que sempre me apoiou e entendeu minha ausência. A Julio, meu anjo da guarda e alma gêmea. Seu amor, paciência e incentivo constantes foram decisivos para a realização desta tese.

À minha doce e forte mãe, que dedica sua vida a espalhar amor e bondade. Inspiro-me em você para ser uma pessoa melhor.

Às minhas queridíssimas irmãs Alessandra e Mariana, pelo amor incondicional, e por estarem sempre prontas para lutar ao meu lado.

Aos meus irmãos de coração Hugo e Fernando, pela amizade e incentivo.

À querida tia Janete, pelo seu amor, apoio e disponibilidade permanente em me ajudar.

Aos meus queridos familiares que já partiram, mas que vivem no meu coração.

À Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie, minha orientadora, pela maravilhosa oportunidade de aprendizado como médica e pesquisadora. Espelho-me em seu rigor científico, dedicação e competência para ser uma médica mais completa, e espero, melhor. Obrigada por seus conselhos, sua confiança e incentivo nas horas difíceis. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. José Pindaro Pereira Plese, meu co-orientador, pelos conselhos e apoio durante toda a minha Residência de Neurocirurgia no HCFMUSP. Obrigada ter acreditado em mim.

Ao Prof.Dr. Manoel Jacobsen Teixeira, por proporcionar a continuidade de meu aperfeiçoamento como neurocirurgiã no HCFMUSP e por realizar o Doutorado.

Ao Prof.Dr. Raul Marino Jr, pela oportunidade de iniciar meus passos na Neurocirurgia, incentivar minha carreira, e me oferecer a oportunidade de continuar aprendendo ao seu redor.

Ao querido amigo Dr. Antonio Almeida e sua família, pelo agradável convívio, incentivo e suporte inestimáveis para a confecção desta tese.

Ao Prof. Dr. Hamilton Matushita, pelo apoio e pela oportunidade de realizar meu aperfeiçoamento em Neurocirurgia Infantil neste hospital.

À Dra Miyuki Uno, querida amiga, que com sua paciência inesgotável e generosidade, auxiliou-me em todos os passos científicos desta tese.

À querida Roseli da Silva, pela ajuda e por compartilhar o interesse científico e o empenho nas pesquisas sobre meduloblastoma.

À querida Gisele Reis, pela ajuda e amizade.

À Dra. Sueli Oba, pela preciosa ajuda na compilação e organização dos casos.

Aos queridos e talentosos amigos pesquisadores do LIM 15, que me trataram como membro da família: Dra Mary, Maria José, Thais Galatro, Thais Freire, Eliene, Marcelo, Mucia, Ester, Renata, Ana Paula, Priscila, Keila, Tamara, Celia e Rosa. Obrigada pela amizade, cumplicidade e incentivo constantes.

Ao Dr. Carlos Clara e sua equipe, pela ajuda e hospitalidade no Hospital do Câncer de Barretos.

Ao Dr. Osmar Moraes e Dr. Paulo Napoli, pela oportunidade de crescimento profissional e apoio ao término desta tese. Obrigada pela confiança e pelo respeito com que sempre me trataram.

Ao Dr. Fabio Godinho e aos residentes de Neurocirurgia do Hospital Santa Marcelina pelo agradável e estimulante convívio.

Ao Prof. Gregory Riggins, que me recebeu de forma tão generosa em seu laboratório na Johns Hopkins University.

Aos amigos do Laboratório de pesquisa em neoplasias do Sistema Nervoso Central da Johns Hopkins University, Dra. I Mei Siu, Dra. Betty Tyler, Dr. Renyuan Bai, Dr. Avadhud Joshi, Dra. Watcharin Loilome, Dra. Shalaja Hajar, e Sra. Brenda Raymond. Obrigada pela amizade e por atenuarem a saudade de casa.

Ao Dr. Fernando Campos G. Pinto e Dra. Nelci Collange pela inspiração pela Neurocirurgia Infantil.

Ao Dr. Sergio Rosemberg pela cuidadosa revisão das lâminas desta casuística.

Ao Dr. Fabio Molinari pela sua ajuda com dados de patologia desta casuística.

Aos queridos neuroanestesistas Dra. Kazuko, Dr. Seigi, Dra. Cristiane, Dr. Ernani, Dr. André e Dra Ana Laura pela competência com os pacientes e carinho comigo.

À Dra Gianni Santos, pela ajuda com as análises estatísticas.

A todos os neurocirurgiões, neurologistas, oncologistas, radioterapeutas e equipe multidisciplinar do HCFMUSP, por sua dedicação e carinho com os pacientes e suas famílias.

Às secretárias da Neurologia Reiko e Sueli pela disponibilidade constante em ajudar.

Aos meus amigos que torcem pelo meu sucesso e felicidade.

Aos pacientes e seus familiares, por sua generosidade e doação em momento de dor.

Ainda que eu ande no vale da sombra e da morte, nada temerei, pois estás comigo (Salmo 23).



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. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005.

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

Summary

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. O meduloblastoma	1
1.2. Considerações sobre a tumorigênese	8
1.2.1. A via Sonic Hedgehog	14
1.2.2 A via do fator neurogênico homólogo 1 ( NOTCH)	16
1.2.3. A via homóloga de <i>Wingless</i> da drosófila( WNT)	17
1.2.4. Os genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i>	20
1.2.5 A intersecção das vias tumorigênicas	25
1.3. A seleção dos genes	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	29
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODO</b>	30
3.1. Casuística	30
3.1.1. Dados clínico-epidemiológicos	30
3.2. Metodologia	32
3.3. Extração de RNA	33
3.4. Transcrição Reversa	34
3.5. PCR quantitativo em tempo real	35
3.6. Análise da expressão dos genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i>	37
3.7. Análise estatística dos dados	38
<b>4. RESULTADOS</b>	40
4.1. Características clínicas	40
4.2. PCR quantitativo em tempo real	48
4.3. Expressão dos genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i>	51
4.4. Correlação fenótipo-nível de expressão gênica	53

4.4.1. Expressão gênica e faixa etária	53
4.4.2. Expressão gênica e topografia tumoral	57
4.4.3. Expressão gênica e tipo histológico	58
4.5. Perfil dos grupos de expressão gênica <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i>	59
4.5.1. Perfil de pacientes <i>OTX1+</i>	60
4.5.2. Perfil de pacientes <i>OTX2+</i>	61
4.5.3. Perfil comparativo de pacientes dos diferentes grupos de expressão gênica	62
4.6. Desenvolvimento de metástases	66
4.6.1. Disseminação inicial	66
4.6.2. Disseminação ao longo da evolução	67
4.7. Curvas de sobrevida para os diferentes grupos de expressão gênica	68
<b>5. DISCUSSÃO</b>	71
5.1. Aspectos clínico-patológicos	71
5.2.A expressão do gene <i>OTX1</i>	74
5.3.A expressão do gene <i>OTX2</i>	75
5.4.Corrrelações grupos de expressão gênica -fenótipo	76
5.4.1.Expressão gênica e idade	76
5.4.2.Expressão gênica e topografia tumoral	77
5.4.3.Expressão gênica e histologia	79
5.4.4.Expressão gênica e metástases	81
5.4.5.Perfis de expressão gênica <i>OTX</i>	81
5.4.6.Expressão gênica e sobrevida	82
5.5.Perspectivas	83
<b>6.CONCLUSÕES</b>	84
<b>7.ANEXOS</b>	85
<b>8.BIBLIOGRAFIA</b>	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APC</b>	Gene do <i>Adenomatous polyposis coli</i>
<b>AXIN1</b>	gene da axina 1
<b>BCRP</b>	Membro 2 da subfamília de proteínas ligantes de ATP
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon de cálcio
<b>CLS</b>	Gene da cardiolipina sintetase
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucléico complementar
<b>cMYC</b>	oncogene da mielocitomatose viral
<b>dNTP</b>	Deoxinucleotídeo trifosfatado.
<b>Dsh</b>	Proteína <i>Dishevelled</i>
<b>et al.</b>	E outros
<b>FMUSP</b>	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>GBP</b>	Proteína transmembrana ligante de guanilato
<b>GLI1</b>	Proteína gli ligante de zinco tipo 1
<b>GLI3</b>	Proteína gli ligante de zinco tipo 3
<b>GSK3β</b>	Glicogênio sintetase quinase 3 beta
<b>GUSβ</b>	Gene da glucuronidase beta
<b>HCFMUSP</b>	Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>HER2</b>	Gene candidato a susceptibilidade ao câncer tipo 2
<b>HER4</b>	Gene candidato a susceptibilidade ao câncer tipo 4
<b>HPRT</b>	Gene da hipoxantina fosforibosiltransferase
<b>HSNF3</b>	Gene da proteína modificadora de cromatina tipo 3
<b>INIIS</b>	Gene do fator de splicing tipo 2
<b>LEF</b>	Fator facilitador linfocitário
<b>MDM2</b>	Gene da proteína ligante de p53 tipo 2
<b>NELL1</b>	Gene da isocitrato desidrogenase tipo 1
<b>NELL2</b>	Gene da isocitrato desidrogenase tipo 2

<b><i>nMYC</i></b>	oncogene da mielocitomatose viral derivado de neuroblastoma
<b>NRSF</b>	Fator silenciador de transcrição
<b><i>NOTCH</i></b>	Gene da proteína delta 4
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b><i>OTX1</i></b>	Gene da proteína homeobox tipo 1
<b><i>OTX2</i></b>	Gene da proteína homeobox tipo 2
<b><i>P53</i></b>	Gene da fosfoproteína p53
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>pb</b>	Pares de bases
<b><i>PDGFR</i></b>	Gene do receptor do fator de crescimento relacionado a plaquetas
<b>PNET</b>	Tumor neuroectodérmico primitivo
<b><i>PTCH</i></b>	Gene da proteína patched tipo 1
<b><math>\beta</math>TRCP</b>	F-box/WD 1A isoforma 1
<b><i>REN</i></b>	Gene da proteína REN
<b><i>REST</i></b>	Gene do fator silenciador neuronal restritivo
<b><i>ROX</i></b>	Gene homeobox ROX
<b>RQ-PCR</b>	PCR quantitativo em tempo real
<b><i>SHH</i></b>	Gene da proteína sonic hedgehog
<b><i>SMO</i></b>	Proteína Smoothed
<b>SNC</b>	Sistema nervoso Central
<b><i>SUFU</i></b>	Gene de Sufu
<b>TRKC</b>	Tirosina quinase
<b>WNT</b>	Via homóloga <i>Wingless</i> da drosófila
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>M</b>	micromolar

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Classificação histológica dos meduloblastomas segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde)	5
Tabela 2:	Critérios de Chang de prognóstico em meduloblastomas	7
Tabela 3:	Histórico de trabalhos que representam marcos relacionados à genética dos meduloblastomas	11
Tabela 4:	Lista de <i>primers</i> utilizados nas reação de PCR em tempo real	37
Tabela 5:	Medidas-resumo do tempo de sobrevida (meses) segundo a faixa idade, histologia e topografia	44
Tabela 6:	Medidas-resumo do tempo de sobrevida (meses) dos indivíduos, segundo presença de disseminação ao diagnóstico inicial da doença.	45
Tabela7:	Medidas-resumo do tempo de sobrevida (meses) dos indivíduos, segundo presença de disseminação leptomeníngea	45
Tabela8:	Perfil fenótipo-nível de expressão gênica nas diferentes faixas etárias	53
Tabela 9 :	Perfil fenótipo- nível de expressão gênica por divisão topográfica	57
Tabela 10:	Perfil fenótipo- nível de expressão gênica nos diferentes subtipos histológicos	59
Tabela 11:	Perfil de expressão gênica <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i> e fenótipo	61
Tabela 12:	Distribuição dos indivíduos segundo a expressão do gene <i>OTX1</i> , resultado dos últimos exames, local da massa tumoral, disseminação inicial (imagem/líquor) e tipo histológico do tumor	62
Tabela 13:	Distribuição dos indivíduos segundo a expressão do gene <i>OTX2</i> , resultado dos últimos exames, local da massa tumoral, disseminação inicial (imagem/líquor) e tipo histológico do tumor.	63
Tabela 14:	Distribuição dos indivíduos segundo a expressão dos genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i> , resultado dos últimos exames,	65

local da massa tumoral, disseminação inicial (imagem/líquor) e tipo histológico do tumor.

Tabela 15: Medidas-resumo do tempo de sobrevida segundo expressão do gene *OTX1* e *OTX2*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2:	Ressonância Magnética correspondendo à disseminação leptomeningea da doença	3
Figura 3:	Ressonância ilustrando o potencial de disseminação do meduloblastoma ao longo do neuroeixo	3
Figura 4:	Mecanismo de sinalização Hedgehog	15
Figura 5:	Figura ilustrativa das vias Hedgehog e WNT	19
Figura 6:	Análise morfológica de embriões murinos/genes <i>OTX</i>	21
Figura 7:	Diagrama demonstrando as principais vias tumorigênicas envolvidas no meduloblastoma	26
Figura 8:	Esquema modificado de Carlotti et al.	27
Figura 9:	Gráficos da distribuição da topografia tumoral e dos tipos histológicos por faixa etária	43
Figura 10:	curvas de Kaplan Meier para comparação de sobrevida dos diferentes grupos	47
Figura 11:	Curva de dissociação dos produtos de PCR em tempo real dos genes <i>OTX1</i> .e <i>OTX2</i>	48
Figura 12:	Curva de amplificação do gene <i>OTX1</i> e curva de eficiência	49
Figura 13:	Curva de amplificação do gene <i>OTX2</i> e curva de eficiência	50
Figura 14:	Gráfico da expressão relativa do gene <i>OTX1</i>	52
Figura 15:	Gráfico da expressão relativa do gene <i>OTX2</i>	52
Figura 16:	Gráfico da expressão dos genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i> por idade	54
Figura 17:	Gráfico da expressão dos genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i> por idade e topografia	55
Figura 18:	Gráfico da expressão dos genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i> por idade e tipo histológico	56
Figura 19:	Relação da expressão do gene <i>OTX1</i> com topografia tumoral	58



Figura 20:	Relação da expressão do gene <i>OTX2</i> com topografia tumoral	58
Figura 21:	Relação da expressão do gene <i>OTX1</i> com os tipos histológicos	60
Figura 22:	Relação da expressão do gene <i>OTX2</i> com os tipos histológicos	60
Figura 23:	Distribuição dos pacientes que apresentaram disseminação leptomeníngea (A) e grupo que apresenta e não apresenta disseminação inicial, para cada perfil de expressão gênica(B).	66
Figura 24:	Perfil dos pacientes que apresentaram disseminação leptomeníngea, em porcentagem para cada perfil de expressão gênica <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i> .	67
Figura 25:	Curvas de Kaplan Meier: em A comparação da sobrevida de pacientes <i>OTX1+</i> versus <i>OTX1-</i> . Em B, comparação da sobrevida de pacientes <i>OTX2+</i> versus <i>OTX2-</i> .	69
Figura 26:	Curvas de Kaplan Meier: em A comparação da sobrevida de pacientes <i>OTX1+OTX2+</i> versus <i>OTX1-OTX2-</i> . Em B, comparação da sobrevida de pacientes <i>OTX1+OTX2+</i> , <i>OTX1-OTX2-</i> , <i>OTX1+OTX2-</i> e <i>OTX1-OTX2+</i> .	69

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O meduloblastoma, tumor maligno do Sistema Nervoso Central mais comum em crianças, foi inicialmente descrito de forma uniforme em 1925 por Bailey e Harvey Cushing. Apesar do avanço diagnóstico e terapêutico, os índices de morbimortalidade persistem altos. Grupos epidemiologicamente semelhantes podem ter desfechos diferentes, e evoluções desfavoráveis ocorrem em pacientes com marcadores de bom prognóstico. Os avanços nas pesquisas em biologia molecular procuram explicar os diferentes comportamentos da doença, e de forma sistemática, buscam identificar genes que sirvam como alvos terapêuticos, já que o tratamento disponível atualmente ainda é bastante insatisfatório e com muitos efeitos colaterais. Simeone e colaboradores identificaram os genes *OTX1* e *OTX2*, presentes em humanos, e cuja função é organizar, compartimentalizar e hierarquizar a formação do sistema nervoso central, especialmente o cerebelo. Os genes *OTX1* e *OTX2* são expressos no tecido cerebelar em humanos até a nona semana de vida extra-uterina, exclusivamente. Os mesmos autores também identificaram que os mesmos genes são alvo terapêutico do ácido transretinóico, que inibe a expressão gênica. Estudos prévios demonstraram a expressão dos genes *OTX1* e *OTX2* em meduloblastomas, o que torna o ácido uma potencial terapêutica para estes tumores, assim como os genes *OTX1* e *OTX2* potenciais alvos para desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. **OBJETIVOS:** Estudar a prevalência dos genes *OTX1* e *OTX2* em uma amostra de 60 pacientes, e estabelecer correlações entre a expressão gênica e aspectos clínicos,

patológicos e de evolução. CASUÍSTICA E MÉTODO: Realizada análise retrospectiva de 60 pacientes com diagnóstico meduloblastoma, operados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e no Hospital do Câncer de Barretos. Organizado um banco de dados de 60 pacientes contendo dados da expressão gênica dos genes *OTX1* e *OTX2* (obtida através da técnica de PCR em tempo real) e dados clínico-epidemiológicos. Realizados testes estatísticos para se estabelecer correlação entre dados clínico-patológicos e de expressão gênica. RESULTADOS: O gene *OTX1* foi expresso em 52% da população estudada, e tal expressão variou com a idade (sendo maior em adultos), localização (preferência por hemisfério) e tipo histológico (desmoplásico). O gene *OTX2* foi expresso em 62% da população estudada, e tal expressão variou com a idade (sendo maior quanto menor a faixa etária), localização (preferência por vérmis) e tipo histológico (clássico). Houve correlação estatística entre a expressão do gene *OTX2* e o desenvolvimento de metástases leptomenígeas. CONCLUSÕES: Na população estudada, a expressão dos genes *OTX1* e *OTX2* corrobora a impressão de seu papel importante na patogênese dos meduloblastomas, e é dependente da idade do paciente, da localização tumoral e do tipo histológico. Dada a sensibilidade do gene ao ácido transretinóico, a identificação deste perfil populacional pode significar no futuro novas perspectivas de tratamento.

Descritores: 1- Meduloblastoma, 2- fatores de transcrição *OTX*, 3- gene *OTX1*, 4- gene *OTX2*, 5- sobrevida, 6- resultado do tratamento.

## **SUMMARY**

**INTRODUCTION:** Medulloblastoma, the most common malignant tumor of the central nervous system in children, was first uniformly described in 1925 by Bailey and Harvey Cushing. Despite the diagnostic and therapeutic advances, the morbidity and mortality rates remain high. Epidemiologically similar groups may have different outcomes, and adverse developments occur in patients with markers of good prognosis. Advances in molecular biology research seeks to explain the different behaviors of the disease, and consistently seek to identify genes that serve as drug targets, since the treatment currently available is still unsatisfactory and with many side effects. Simeone and colleagues identified genes *OTX1* and *OTX2* in humans, and whose function is to organize, prioritize and compartmentalize the formation of the central nervous system, especially the cerebellum. *OTX1* and *OTX2* genes are expressed in cerebellar tissue in humans until the ninth week of extra uterine life, exclusively. The same authors also found that the same genes are therapeutic target of trans-retinoic acid, which inhibits gene expression. Previous studies have demonstrated the expression of *OTX1* and *OTX2* genes in medulloblastomas, which makes the acid a potential therapy for these tumors, as well as the genes *OTX2* and *OTX1* potential targets for developing new therapeutic drugs. **OBJECTIVES:** To study the prevalence of *OTX1* and *OTX2* genes in a sample of 60 patients, and to establish correlations between gene expression and clinical, pathological and follow up aspects. **CASUISTICS AND METHODS:** A retrospective analysis of 60 patients diagnosed with medulloblastoma, assisted at Hospital of the

Faculty of Medicine, University of São Paulo, and the Cancer Hospital of Barretos. Organized a database of 60 patients which contains the gene expression of *OTX1* and *OTX2* genes (obtained through the technique of real-time PCR) and clinical and epidemiological data. Performed statistical tests to establish a correlation between clinical-pathological and gene expression. RESULTS: The *OTX1* gene was expressed in 52% of the population studied, and such expression varied with age (being higher in adults), location (preferably by hemisphere) and histology (desmoplastic). The *OTX2* gene was expressed in 62% of the studied population, and such expression varied with age (being higher the younger the age group), location (preferably vermis) and histological type (classical). A statistical correlation between the expression of *OTX2* gene and development of leptomeningeal metastases was observed. CONCLUSIONS: In the studied population, the expression of *OTX1* and *OTX2* genes corroborates the impression of his role in the pathogenesis of medulloblastomas, and is dependent on patient age, tumor location and histological type. Given the sensitivity of the gene-trans retinoic acid, the identification of the population profile in the future will represent new opportunities for treatment.

Descriptors: 1- Medulloblastoma, 2-*OTX* transcriptional factors, 3- *OTX1* gene, 4- *OTX2* gene, 5- survival, 6- outcome.

## **1. INTRODUÇÃO**

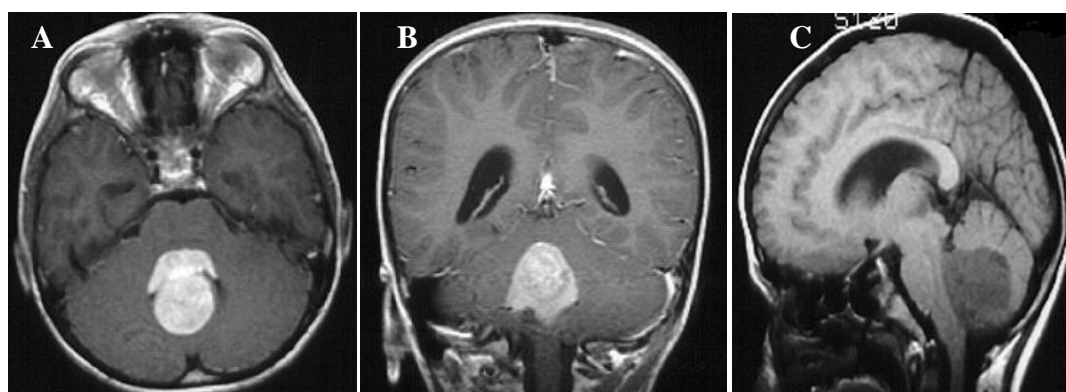
### **1.1. O meduloblastoma**

O meduloblastoma, tumor cerebelar da classe dos tumores neuroectodérmicos primitivos (PNETS), é conhecido e catalogado desde 1925, quando Cushing o descreveu como um tumor de maior incidência em crianças do sexo masculino, altamente agressivo e invasivo, com grande potencial de disseminação liquórica e com sobrevida extremamente curta (Bailey et al., 1925). Suas séries relatavam uma sobrevida de apenas 1,6% dos pacientes ao final de três anos, e a qualidade de vida dos pacientes era sabidamente ruim. Aspectos descritos por Cushing ainda aplicam-se: é o tumor cerebelar maligno mais comum na infância, e estima-se que nos Estados Unidos da América, a cada ano, notifique-se de 300 a 500 novos casos de meduloblastoma. Destes, 75 % são jovens com idades inferiores a 19 anos e 50% são crianças com idade inferior a cinco anos (Crawford et al. 2007; Ertan et al., 2009). O meduloblastoma apresenta maior incidência em crianças (preferencialmente do sexo masculino), mas também pode acometer adultos. Aproximadamente 0,5% a 1% dos tumores do sistema nervoso central (SNC) dos adultos são meduloblastomas, e alguns autores defendem que neste grupo o prognóstico é melhor (Sarkar et al., 2002).

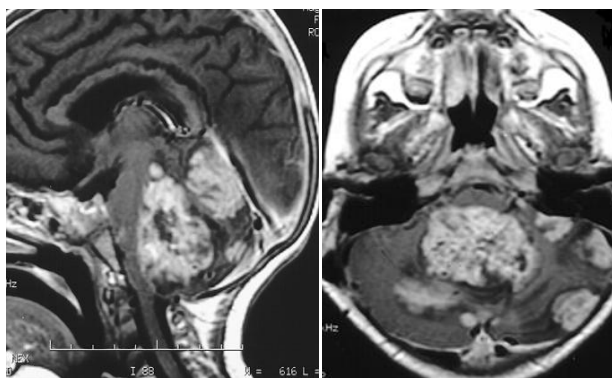
Do ponto de vista clínico, os pacientes com meduloblastomas primariamente diagnosticados apresentam sintomas relacionados à topografia cerebelar do tumor, como distúrbios da marcha, incoordenação e

tremores. Cefaléia, náuseas e vômitos são também sintomas muito prevalentes, e estão relacionados na maioria das vezes à presença de hidrocefalia: freqüentemente há bloqueio do fluxo liquórico ao nível do quarto ventrículo pelo processo expansivo, ocasionando desta forma, hidrocefalia supratentorial não comunicante. De forma incomum, os pacientes podem apresentar sintomas relacionados à disseminação leptomenígea do tumor, como parestesia de nervos cranianos.

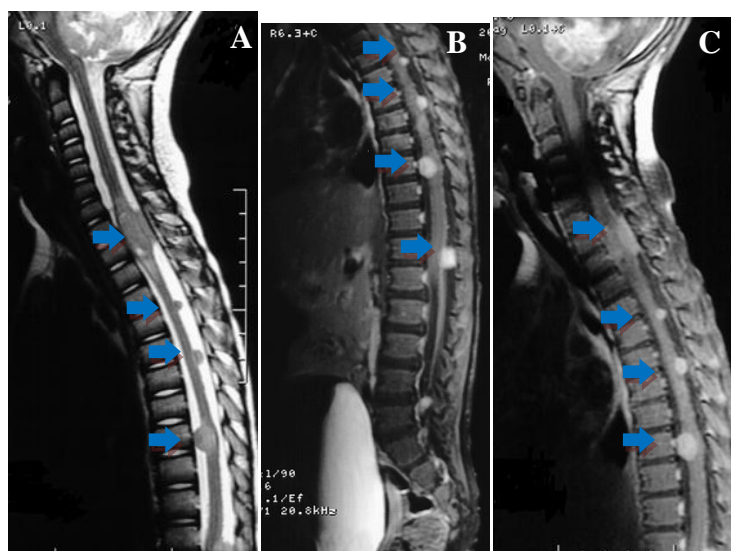
Radiologicamente, o tumor apresenta-se como uma massa cerebelar (vermiana, preferencialmente, mas que alternativamente pode acometer os hemisférios cerebelares), freqüentemente associada à hidrocefalia, com evidencia-se na figura 1. A disseminação leptomenígea, freqüente causa de mortalidade, pode acometer o compartimento intracraniano, ou o intra-raquiano, com compressão de estruturas adjacentes e bloqueio do fluxo liquórico. Tais aspectos podem ser verificados nas figuras 2 e 3:



**Figura 1:** Aspectos típicos do meduloblastoma. Sequência de Ressonância Magnética do encéfalo de paciente operada no HCFMUSP em corte axial T1 com contraste (A), T1 coronal com contraste (B) e T1 sagital sem contraste (C), respectivamente, mostrando aspectos típicos do meduloblastoma: massa cerebelar, vermiana, captante de contraste, e com dilatação ventricular.



**Figura 2:** Disseminação leptomeníngea de meduloblastoma. Ressonância Magnética de paciente operada no HCFMUSP aquisição T1 com contraste em corte sagital (A) e axial (B) do encéfalo, evidenciando processo expansivo captante de contraste (meduloblastoma), com múltiplas lesões satélites, correspondendo à disseminação leptomeníngea da doença.



**Figura 3:** Disseminação leptomeníngea ao longo do neuroeixo. Ressonância Magnética paciente operada no HCFMUSP em cortes sagitais da coluna cervico-torácica (A e C) e tóraco-lombar (B), ilustrando o potencial de disseminação do meduloblastoma ao longo do neuroeixo descrito por Cushing. Notam-se múltiplas lesões (setas) com compressão medular.

Macroscopicamente, os meduloblastomas são tumores compactos, densamente vascularizados, róseos ou avermelhados, com predileção pelo vérmis cerebelar. Têm grande potencial infiltrativo, muitas vezes impedindo sua ressecção completa. Tais características representam dificuldades no



momento da ressecção cirúrgica destes tumores, no que diz respeito à hemostasia e preservação de estruturas nobres.

Embora os aspectos clínicos, radiológicos e de macroscopia sejam relativamente semelhantes, os aspectos histológicos não o são (Szymas et al., 1987; Min et al., 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define cinco variantes histológicas do meduloblastoma (Feiden et al., 2008): clássico, desmoplásico, células gigantes, anaplásico e extensa nodularidade, cujas características principais são apresentadas na tabela 1. Tais subtipos diferem em relação à frequência, apresentação clínica e prognóstico, descritos a seguir.

**Tabela 1:** Classificação histológica dos meduloblastomas segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde).

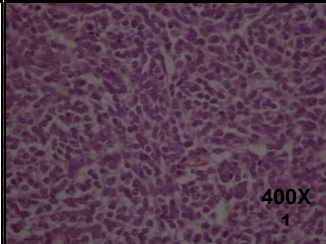
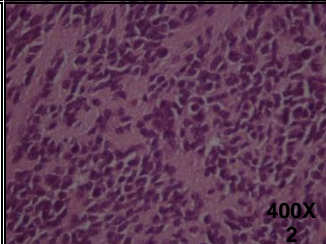
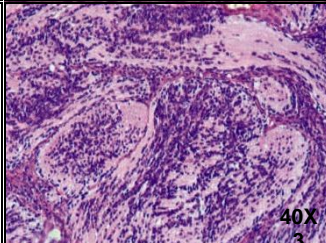
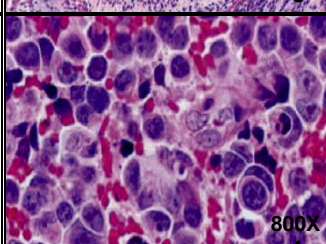
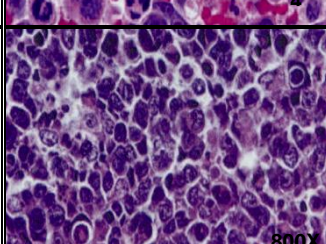
SUBTIPO	FOTOMICROGRAFIA (HEMATOXILINA-EOSINA)	CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA
CLÁSSICO	 400X 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>-células agrupadas</li> <li>-núcleo arredondado</li> <li>-alta atividade mitótica</li> <li>-apoptose</li> <li>-rosetas neuroblásticas</li> <li>-escassez de citoplasma</li> </ul>	-variante mais comum (80%) (Giangaspero et al. 1999)
DESMOPLÁSICO	 400X 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>-células em alta proliferação</li> <li>-ilhas pálidas</li> <li>-nódulos com baixa celularidade</li> <li>-nódulos hiper Cromáticos</li> <li>-ilhas com alta densidade de colágeno e fibras de reticulina sem padrão nodular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-15% dos meduloblastomas</li> <li>-relacionado à idade adulta</li> <li>-relacionado a bom prognóstico (Katsetos et al., 1989)</li> </ul>
EXTENSA NODULARIDADE	 40X 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>-células ganglionares</li> <li>-nódulos com diferenciação neurocítica</li> <li>-Uniformidade nuclear intranodular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-raro</li> <li>-considerado uma variante desmoplásica</li> <li>-mais freqüente em crianças &lt;3 anos</li> <li>-melhor prognóstico? (Suresh et al., 2004)</li> </ul>
CÉLULAS GIGANTES	 800X 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>-aumento do volume celular</li> <li>-alto índice mitótico</li> <li>-polimorfismo nuclear</li> <li>-citoplasma abundante</li> <li>-alta freqüência de corpos apoptóticos agrupados ou isolados</li> </ul>	-4% dos meduloblastomas -relacionado à agressividade biológica (Ellison et al., 2002)
ANAPLÁSICO	 800X 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>-raro</li> <li>-polimorfismo nuclear</li> <li>-alta atividade mitótica</li> <li>-células esféricas</li> <li>-núcleo proeminente</li> <li>-atipia celular marcante</li> </ul>	-raro - relacionado à agressividade biológica (Rodriguez et al. 2007)

Figura 1: paciente desta casuística(n 39). Figura 2: Paciente desta casuística (n 32). Figura 3 : Extraído de Suresh et al., 2004. Figura 4: Extraído de Ellison et al., 2002. Figura 5: Extraído de Rodriguez et al., 2007.

O tratamento consagrado para o meduloblastoma contempla a ressecção cirúrgica, seguida de terapias complementares. O ato cirúrgico apresenta particularidades que exigem técnica apurada e experiência do neurocirurgião. A localização do tumor em área de complexa anatomia, a rica vascularização tumoral (representando hemostasia de difícil execução), e a íntima relação com o tronco cerebral em pacientes que não toleram sangramentos volumosos são apenas algumas destas particularidades.

O tratamento complementar compreende a quimioterapia e a radioterapia de todo o neuroeixo (Chimtagumpala et al.,2001). Apesar dos avanços destas modalidades, como a radiocirurgia (Barket al.,2005;Mirabel et al, 2006; Lafay-Cousin et al., 2009) e novas drogas quimioterápicas mais específicas, estas ainda apresentam importantes efeitos colaterais(Blatt et a.,1991;Brossard et al.,1994). Tais reações adversas muitas vezes impedem sua aplicação, especialmente em crianças menores de três anos. (Watterson et al., 1993; Gajjar et al., 1994; Chamberlain et al., 1998; Sun et al., 2002; Rutowski et al., 2005; Etzel et al., 2006; Yazigi-Rivard et al., 2008; Ward et al., 2009; Nomura et al., 2009; Skowronska, 2009). De forma semelhante ao perfil histológico, a evolução clínica e o prognóstico dos pacientes também não são homogêneos. Pacientes com características clínicas de bom prognóstico muitas vezes apresentam sobrevida menor que pacientes com indicadores de mau prognóstico. O oposto é verdadeiro. Muitos pacientes com fatores de mau prognóstico, por vezes apresentam evolução clínica favorável.

Indicam-se como fatores prognósticos os critérios de Chang (1969) (descritos na tabela 2); a idade e o grau de ressecção cirúrgica. A idade menor que três anos foi descrita como fator de mau prognóstico por autores como Albright et al. (1996), Abacioglu et al. (2002) e Akai et al. (2004). Inversamente, adultos tendem a apresentar melhor prognóstico (Malheiros et al., 2002; Ang et al., 2008; Curran et al., 2009). A análise de prognóstico pós operatório feita por Albright et al. em 1996 mostrou que a sobrevida é maior nos casos em que a ressecção foi maior que 90% em relação aos casos com ressecção menor que 90%.

**Tabela 2:** Critérios de Chang de prognóstico em meduloblastomas

<b>TUMOR</b>	<p>T1 - tumor &lt; 3 cm, envolvendo apenas 1 estrutura da fossa posterior</p> <p>T2 - tumor &lt; 3 cm, envolvendo 2 ou mais estruturas da fossa posterior</p> <p>T3a - tumor &gt; 3 cm, envolvendo 2 ou mais estruturas da fossa posterior</p> <p>T3b - tumor invadindo o assoalho do quarto ventrículo</p> <p>T4 - tumor com extensão além da fossa posterior, atingindo o terceiro ventrículo, ou caudalmente até a cisterna magna; ou associados à hidrocefalia.</p>
<b>METÁSTASES</b>	<p>M0 - sem evidência de metástases ou disseminação</p> <p>M1 - citologia oncótica positiva no LCR</p> <p>M2 - disseminação leptomeníngea intracraniana</p> <p>M3 - disseminação leptomeníngea intra-raquiana</p> <p>M4 - metástases extraneurais</p>

A sobrevida dos pacientes com diagnóstico de meduloblastoma varia de 40% a 70% em 05 anos, segundo diversos autores (Kunschner et al., 2001; Malheiros et al., 2002; Mirabell et al., 2006; Yazigi-Rivard et al., 2008), e a maior limitação no tratamento destes pacientes é ainda a compreensão insuficiente da doença, o que impede o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes.

## **1.2. Considerações sobre a tumorigênese**

A heterogeneidade dos meduloblastomas, a incongruência entre os fatores prognósticos e a taxa de sobrevida dos pacientes, associados à eficácia ainda insatisfatória do tratamento e a pequena compreensão sobre a doença sinalizavam há tempos a necessidade de estudos sobre a tumorigênese. Esperava-se que tais estudos, no âmbito da genética e da biologia molecular, explicassem a heterogeneidade da doença, seus aspectos clínicos e histopatológicos. Com tais ferramentas, seria possível desenvolver terapêuticas que atuassem em pontos críticos no desenvolvimento dos meduloblastomas, impedindo seu desenvolvimento e progressão.

A partir de 1987 vários grupos de pesquisa dedicaram-se a elucidar os processos genéticos e moleculares envolvidos na tumorigênese dos meduloblastomas. O diagnóstico de anormalidades cromossômicas foi a primeira modalidade de pesquisa. Lattimer et al. (1987) iniciaram as investigações observando várias anormalidades cromossômicas em

meduloblastomas, linha de pesquisa seguida por Biegel et al. (1989), que apontaram a alta frequência do isocromossomo 17. Tal linha de pesquisa ainda encontrou contribuição no grupo de Pietsch et al. (1998), que descreveram a hipótese da existência de grupos de genes supressores de tumor no cromossomo 1, e Adesina et al. (2000), que demonstraram a perda alélica do cromossomo 17 em meduloblastomas.

Outra tática da pesquisa genética foi a tentativa de isolamento e investigação de genes envolvidos na tumorigênese dos meduloblastomas. Autores como Gilbertson et al. descreveram mutações nos genes *HER2* e *HER4*, conhecidos por estarem envolvidos em vários tipos de tumores, como gliomas e adenocarcinomas. Em 2000, Lawinger et al. descreveram mutações nos genes *REST* em meduloblastomas, seguidos por Herms et al. (2000), que apontam o gene *cMYC* como marcador de mau prognóstico. A identificação de genes envolvidos seguiu-se então com Maeda et al. (2001), Lee et al. (2001), Giordana et al. (2002), Chopra et al. (2003), Sardi et al. (2003), e outros autores citados na tabela 3. As descrições do envolvimento de tais genes, embora de fundamental importância, representavam dados isolados e que não elucidavam de forma satisfatória os mecanismos envolvidos na gênese dos meduloblastomas. A identificação isolada de genes foi então preterida em favor da descrição de prováveis vias tumorigênicas e seus respectivos genes. A identificação dos mesmos proporcionou o maior entendimento da doença e a possibilidade de intervenção terapêutica em alvos moleculares específicos para cada via tumoral.

Tais pesquisas com as vias tumorais envolvidas nos meduloblastomas iniciaram-se em 1992, quando Simeone et al. descreveram os genes *OTX*. O conhecimento desta via, até hoje restrito, foi complementado por Kasturi et al. (1993), que descreveram os genes *OTX1* e *OTX2* em humanos; por Michiels et al., que descreveram a associação da via *OTX* com meduloblastomas, culminando com Di et al. (2005), que descreveram o gene *OTX2* como alvo terapêutico do ácido transretinóico em meduloblastomas. Em 2010, Adamson et al. descreveram a via do gene *OTX2* como mecanismo independente e auto suficiente para a formação de meduloblastomas.

Outra via tumoral, a via Sonic Hedgehog, foi descrita inicialmente por Vorechovský et al., em 1997, e confirmada por Echelard et al., em 1993, como via crítica na formação de meduloblastomas.

Outras vias, também críticas na formação dos meduloblastomas, como a via homóloga de *Wingless* da drosophila (*WNT*) e a via do fator neurogênico homólogo 1 (*NOTCH*) foram descritas respectivamente em 1998 e 2004.

O resumo destes marcos na pesquisa dos meduloblastomas, organizados em ordem cronológica, podem ser observados na tabela (3) a seguir:

**Tabela 3:** Histórico de trabalhos que representam marcos relacionados à genética dos meduloblastomas

<b>AUTOR</b>	<b>ANO</b>	<b>DESCRIÇÃO DOS TRABALHOS</b>
Latimer et al.	1987	Anomalias nos cromossomos 1, 3, 5, 6, 11, 16, e, 17 em meduloblastomas
Biegel et al.	1989	Isocromossomo 17 associado a meduloblastomas
Saylors et al.	1991	Mutações do gene <i>p53</i> em meduloblastomas
Simeone et al.	1992	Descrição dos genes <i>OTX</i>
Kastury et al.	1993	Descrição dos genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i> em humanos
Echelard	1993	Descrição da via Hedgehog
Simeone et al.	1995	Descrição da inibição dos genes <i>OTX</i> pelo ácido transretinóico
Vorechovský	1997	Envolvimento do gene <i>Shh</i> em meduloblastomas
Gilbertson	1998	Mutações em <i>HER2</i> e <i>HER4</i> em meduloblastomas
Pietsch et al.	1998	Genes supressores no locus 1q31 em meduloblastomas
Zurawel	1998	Envolvimento da via <i>WNT</i> com meduloblastoma
Michiels	1999	Envolvimento dos genes <i>OTX</i> com meduloblastomas
Adesina et al.	2000	Perda alélica 17p 13 em meduloblastomas
Liu et al.	2000	Ácido transretinóico aumenta quimiossensibilidade de células de meduloblastoma
Lawinger et al.	2000	Mutações em <i>REST</i> em meduloblastomas
Herms et al.	2000	cMYC como marcador de mau prognóstico em meduloblastomas
Zurawel et al.	2000	Envolvimento da via Hedgehog com meduloblastomas



**Tabela 3(continuação):** Histórico de trabalhos que representam marcos relacionados à genética dos meduloblastomas

<b>AUTOR</b>	<b>ANO</b>	<b>DESCRIÇÃO DOS TRABALHOS</b>
Lee et al.	2002	Hiperexpressão de <i>cMYC</i> e <i>nMYC</i> em meduloblastomas
Giordana et al.	2002	MDM2 como marcador de mau prognóstico em meduloblastomas
Chopra et al.	2003	Amplificação de <i>cMYC</i> e <i>HER2</i> em meduloblastomas
Sardi et al.	2003	Perda da heterozigozidade do <i>p53</i> em meduloblastomas
Hernan et al.	2003	<i>HER2</i> como marcador de metástases em meduloblastomas
MacDonald et al.	2003	PDGFR como potencial alvo terapêutico em meduloblastomas
Wong et al.	2003	Mutações no DNA mitocondrial em meduloblastomas
Yokota et al.	2004	Associação da via NOTCH e <i>OTX2</i> com meduloblastomas
Ray et al.	2004	<i>MYC</i> , <i>p53</i> , <i>HER2</i> , <i>TRKC</i> são fatores preditivos de sobrevivência em meduloblastomas
Eberhart	2004	<i>MYC</i> e <i>TRKC</i> como fatores de prognóstico em meduloblastomas
Fuller et al.	2004	<i>REST</i> e <i>NRSF</i> silenciados em meduloblastomas
Di C et al.	2005	O gene <i>OTX2</i> é alvo terapêutico do ácido transretinóico em meduloblastomas
Boon et al.	2005	Amplificação do gene <i>OTX2</i> em meduloblastomas
de Haas et al.	2006	Correlação clinico-patológica dos genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i> em meduloblastomas
Carlotti et al.	2008	Múltiplas vias tumorigênicas em meduloblastomas
Adamson et al.	2010	<i>OTX2</i> é crítico para tumorigênese independente de meduloblastomas

Após 23 anos de pesquisas, acredita-se que a heterogeneidade dos meduloblastomas advém da sua heterogeneidade genética (Gulino et al., 2008). É muito provável que o conjunto de tumores conhecidos uniformemente por “meduloblastoma” seja semelhante apenas em aspectos como a localização cerebelar e apresentação clínica, histologia e potencial metastático. Sob a óptica da genética e da biologia molecular, tais tumores provavelmente são distintos e sua classificação ultrapassada. Como na maioria das neoplasias, várias vias tumorigênicas podem estar implicadas na formação de um único clone tumoral. Desta forma, pacientes com meduloblastoma apresentam ativação de genes e vias tumorigênicas distintas, o que confere, para cada indivíduo, características clínicas, patológicas e prognósticas únicas. Tal conceito motivou autores, como Gulino et al. (2008), Kool et al. (2008) e Marino et al. (2009), a proporem uma classificação genético molecular, baseada nas vias tumorigênicas envolvidas em cada tumor, para cada paciente.

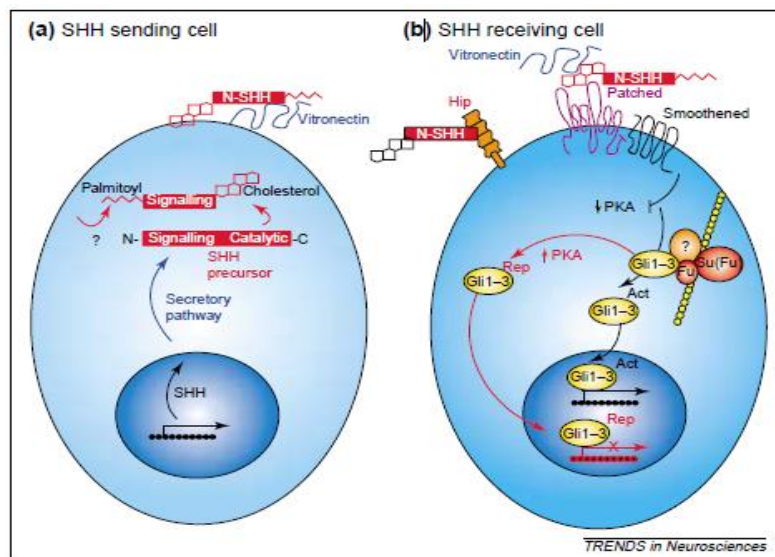
Nos últimos cinco anos, a maioria das pesquisas concentra-se em quatro vias principais: via Hedgehog, a via Wnt, a via NOTCH e a do gene *OTX2*. As duas primeiras foram descritas há mais tempo e, portanto, são as mais estudadas até hoje. Estas quatro vias foram descritas anteriormente como independentes, porém atualmente são reportadas intersecções e sobreposições das mesmas. Embora não se conheça todo o esquema genético-molecular, é provável que os meduloblastomas surjam pela ativação organizada de uma ou mais delas. Com o crescimento e desenvolvimento do tumor, outras vias podem ser sucessivamente ativadas,

conferindo uma marcante versatilidade genética e antigênica ao tumor. A seguir, são descritas as principais vias tumorigênicas relacionadas aos meduloblastomas.

### **1.2.1. A via Sonic Hedgehog (Shh)**

Sonic Hedgehog é uma proteína autoproteolítica que ativa mecanismos celulares essenciais (a via de sinalização Hedgehog) ao fenômeno da embriogênese nos cordados, especialmente em humanos. Esta proteína é o principal componente de uma via que estabelece diversos destinos de diferenciação celular, padrões de formação e desenvolvimento tecidual, proliferação e diferenciação em múltiplos tipos de tecidos, incluindo o SNC (Duman et al., 2002; Ferretti et al., 2005; Shahi et al., 2008). A via canônica de sinalização da proteína Hedgehog (e portanto, da via Sonic Hedgehog) é fundamentada na sua interação com dois tipos de receptores de membrana: Patched (PTC) e Smoothened (Smo). O receptor Smo tem como função a transdução de sinais, através da ação conjunta com segundos mensageiros, e ativação de fatores de transcrição, como a proteína Gli1-3. Na ausência de um ligante (a proteína Hedgehog), a proteína PTC inibe a expressão do receptor Smo, direta ou indiretamente. Na presença da proteína Hedgehog, verifica-se o aumento expressão do receptor Smo. Esta hiperexpressão determina, através de transdução de sinais e ativação da proteína SuFu, o acúmulo intercelular e a ativação do fator de transcrição Gli. Tal fator de transcrição penetra no núcleo celular e determina a replicação celular

(Cohen et al., 2003; Di Marcotulio et al., 2006; Yoon et al., 2009). Verifica-se desta forma, que mutações em quaisquer pontos desta via podem ocasionar graves alterações no ciclo e morfologia celulares, levando conseqüentemente ao aparecimento de células com potencial reprodutivo ilimitado, sem hierarquização, e potencialmente cancerosas (Dong et al., 2000; Toftgard, 2000; Fearnhead et al., 2001; Kimura et al., 2005). Diversos autores como Raffel et al. (1997), Huang et al. (2000); Berman et al. (2002); Taylor et al. (2002); Bar et al. (2007); Hatton et al. (2008) já descreveram mutações dos genes (PTC, Smo) da via Hedgehog, associada a meduloblastomas. Estão descritos ainda modelos experimentais que reproduzem a mutações da via Hedgehog com o conseqüente aparecimento de meduloblastomas (Kimura et al., 2005), e outros que descrevem a supressão da via como fator determinante na involução destes tumores (Mao et al., 2006).



**Figura 4:** Mecanismo de sinalização Hedgehog (Martí et al., 2002). Observa-se em (a) a ativação celular da proteína Sonic Hedgehog (Shh), que será conjugada a moléculas de colesterol e secretada pela célula. Em (b), a proteína conjugada se liga com as proteínas Patched e Smoothened, ativando desta forma o ciclo celular.

Com o conhecimento sobre a via Hedgehog, e sua implicação com a gênese dos meduloblastomas, foi desenvolvida a droga LDE 225, qual age inibindo a via Shh. Seu uso está sendo testado em protocolo experimental (fonte <http://www.clinicaltrials.gov>) e já estão disponíveis resultados preliminares (Garber, 2008).

### **1.2.2 A via do fator neurogênico homólogo 1 ( NOTCH)**

A via NOTCH é um sistema de sinalização celular altamente conservado e presente na grande maioria dos cordados. Esse sistema é crítico para a comunicação inter e intracelular, na angiogênese, no crescimento e desenvolvimento neuronal e na replicação celular (Brou et al., 2000). A via é composta por uma família de proteínas de membrana, as proteínas NOTCH, que uma vez ativadas por ligantes específicos (anticorpos, fatores de crescimento, etc.) cálcio-dependentes, iniciam uma cascata de segundos mensageiros que culmina na ativação de um fator de transcrição, a proteína Cardiolipina sintetase, ou CLS (Gaiano et al., 2002). Entre as atribuições da proteína CLS está a capacidade de estimular o ciclo celular, e desta forma, a proliferação celular (Bolós et al., 2007). Autores como Garber et al. (2007); Kato et al. (2007) já descreveram a participação da via NOTCH e as mutações de seus genes na gênese do meduloblastoma. Garber et al. (2007) ainda apontam tal via tumorigênica como alternativa para desenvolvimento de novas drogas para o tratamento do meduloblastoma. Atualmente há protocolos clínicos para tratamento do

meduloblastoma utilizando antagonistas da via NOTCH, como a droga MK 0752, ainda sem resultados preliminares (referência <http://clinicaltrials.gov/>).

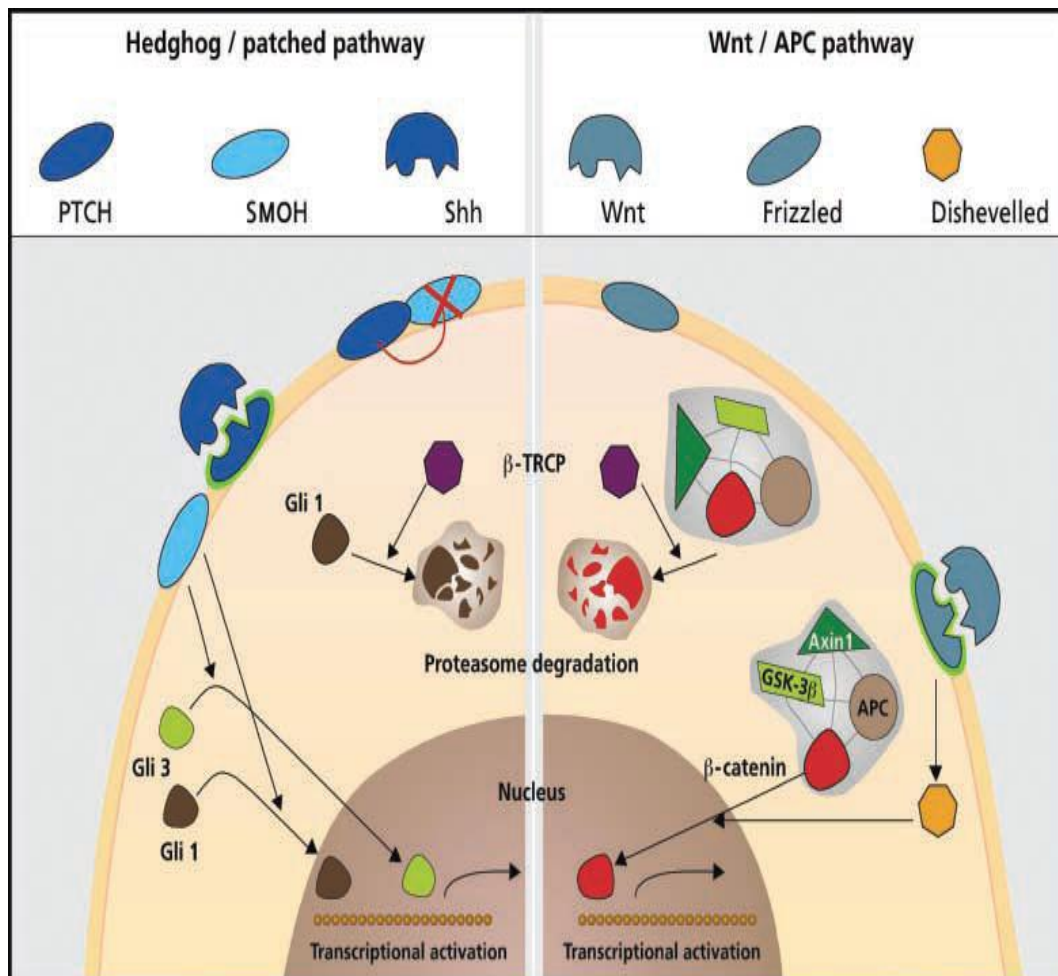
### **1.2.3. A via homóloga de *Wingless* da drosophila (*WNT*)**

As proteínas WNT são uma família de glicoproteínas cuja atividade durante o desenvolvimento embrionário é muito importante, propiciando especialização, adesão e sinalização celulares (Barker, 2008). Na espécie humana existem 19 genes *WNT*, muitos deles codificadores de isoformas das proteínas relacionadas à via WNT, o que denota sua versatilidade funcional. As proteínas WNT exercem sua função de sinalização celular através da ligação com proteínas receptoras Frizzled, que de forma semelhante às proteínas WNT, também exibem diversidade e versatilidade genética. Após a ligação e ativação dos receptores Frizzled pela proteína WNT, há três alternativas de sinalização: a via da  $\beta$ -catenina, a via da polaridade celular e a via WNT- $\text{Ca}^{2+}$ . A via da  $\beta$ -catenina é a mais conhecida e estudada, e tem implicações determinantes no ciclo celular (da Silva, 2007). A  $\beta$ -catenina é uma proteína citoplasmática fundamental na agregação e adesão celulares durante a embriogênese e morfogênese teciduais (Barth et al., 1997). Na ausência da proteína Wnt, o pool de sinalização da  $\beta$ catenina é mantido em baixos níveis através de sua degradação. A  $\beta$ -catenina é ligada a proteínas de degradação e processada pelos proteossomos, e é então fosforilada através de um processo que envolve a axina 1, proteína APC e a proteína GSK3 $\beta$ . Esta etapa também é

regulada pela proteína F-box/WD 1A isoforma 1 ( $\beta$ TRCP), presente também na via Hedgehog.

Através do sinal WNT, há recrutamento da proteína GBP, que previne a degradação da  $\beta$ -catenina. Desta forma, os níveis de  $\beta$ -catenina mantêm-se baixos, mas estáveis, e entram no núcleo celular ligada a fatores de transcrição, como o LEF (Lymphoid enhancer factor) ou a proteína Dishevelled. Essa associação leva à transcrição de genes alvos *WNT*, como a ciclina D e a ciclina E (Pozniak et al., 2006, da Silva, 2007; Wada et al., 2008; Danesin et al., 2009). Uma vez ativada tal via, a célula inicia processos que podem resultar em proliferação, perda da diferenciação e formação de tumores (Zurawel et al., 1998; Koch et al. 2001, 2007).

Mutações na via da  $\beta$ -catenina são, portanto, importantes fatores de risco para a ocorrência de meduloblastomas, já que podem ativar intensamente o ciclo celular (Eberhart et al., 2002; da Silva, 2007) e ocasionar alterações de especialização e adesão celulares. Tais fenômenos contribuem para o aparecimento de células com grande capacidade replicativa (tumores) e de adesão celulares (metástases) (Taylor et al.2004, da Silva,2007; Barker, 2008 ; Roop et al.,2008; Wada et al.,2008 ; Yang et al.,2008).



**Figura 5:** Figura ilustrativa das vias Hedgehog e Wnt. Nota-se como denominador comum a proteína  $\beta$ TRCP. Em parte dos meduloblastomas, tais vias estão continuamente ativadas, levando à proliferação celular desordenada. (Marino et al., 2005).

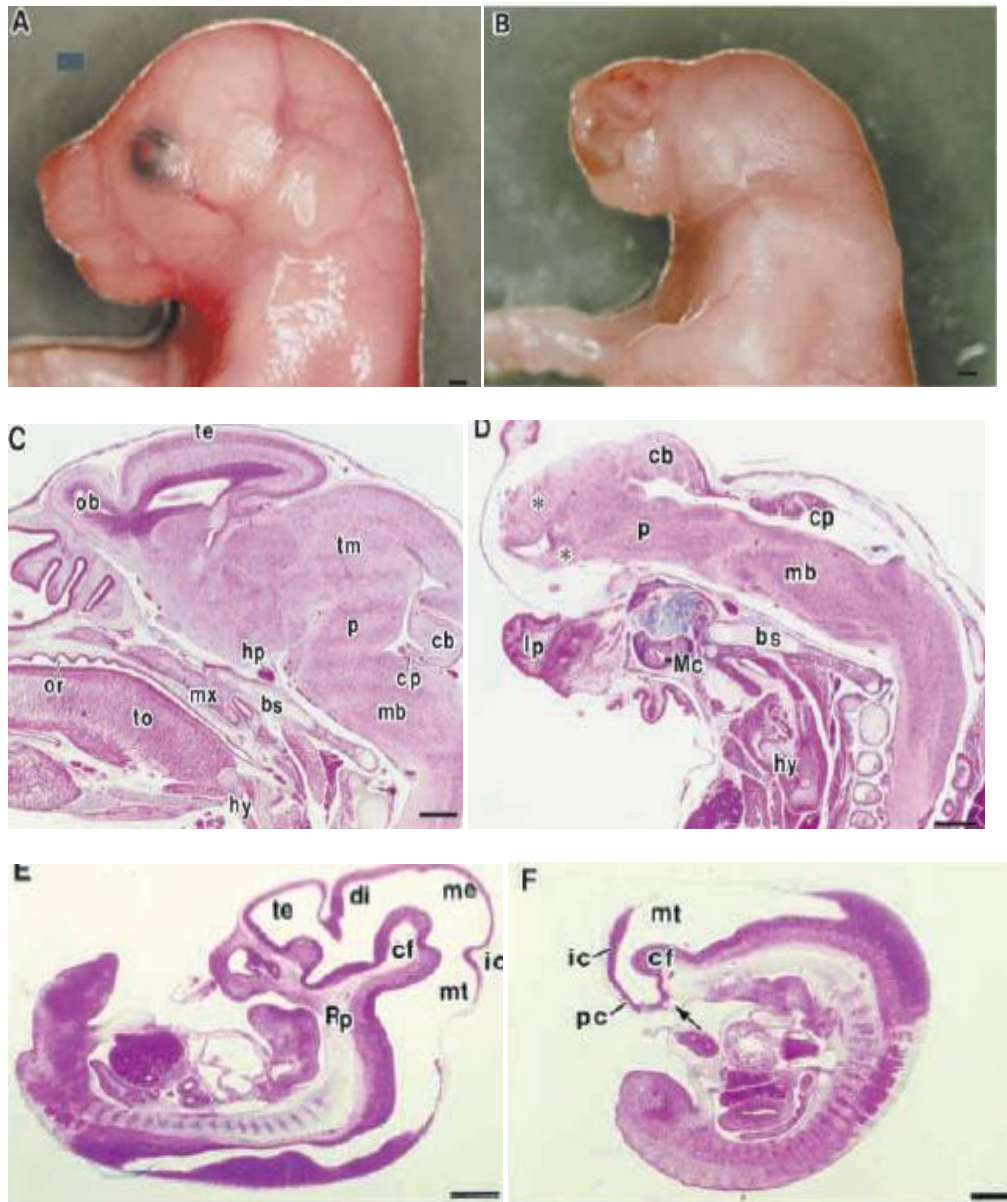


#### 1.2.4. Os genes *OTX1* e *OTX2*

Em 1992, Simeone et al. descreveram a família de genes *OTX*, subgrupo da grande família homeobox, genes determinantes da morfologia e fisiologia dos embriões cordados. Este subgrupo compreende seis genes (*OTX1* a *OTX6*) nos metazoários, e são o principal mecanismo de controle da formação, diferenciação e compartimentalização do Sistema Nervoso Central. Tal atribuição fez com que, posteriormente, autores como Broccoli et al.(1999); Boyl et al.(2001) e Akagi et al.(2004) os chamassem de “maestros” da embriogênese do SNC.

Atribui-se maior importância, dentro da família *OTX*, aos genes *OTX1* e *OTX2* (Suda et al., 1996). Estes autores desenvolveram uma série de experimentos com embriões murinos para verificar a importância dos genes *OTX1* e *OTX2* na formação e hierarquização do SNC. Através de técnicas de silenciamento gênico, Suda obteve embriões que não expressavam os genes *OTX1* ou *OTX2*. Os embriões obtidos apresentavam graves malformações do Sistema Nervoso Central, com desorganização morfológica e funcional.

A figura (6) a seguir mostra alguns detalhes do trabalho de Suda. Pode-se verificar a importância dos genes *OTX1* e *OTX2* para a formação do SNC, comparando os embriões mutantes com embriões normais.



**Figura 6:** Análise morfológica de embriões murinos/genes *OTX*. Na coluna da direita, representada pelas figuras A, C e E, são mostrados embriões *OTX1* e *OTX2* positivos. Nota-se a adequada formação cefálica (A), do telencéfalo (C) e da notocorda (E). Na coluna da esquerda, vemos outro embrião, com silenciamento do gene *OTX1*, apresentando inadequada morfologia cefálica(B), desorganização estrutural do telencéfalo (D) e da notocorda (F). Suda et al.,1996.

No homem há somente as variações *OTX1* e *OTX2* (Acampora et al., 2000; Simeone et al., 2002; Panto et al., 2004; Ando et al., 2008). O gene *OTX1* está localizado no *locus* 2p15-p22 e codifica o fator de transcrição *OTX1*, que possui 243 aminoácidos. O gene *OTX2* está localizado no *locus* 14q21-q22 e codifica o fator de transcrição *OTX*, com 289 aminoácidos.

Como genes homeobox, os genes *OTX1* e *OTX2* controlam a formação, diferenciação e compartimentalização do SNC, especialmente do cerebelo (Acampora et al., 1999). Estes genes são extremamente ativos até a nona semana de vida extra-uterina, silenciando-se a partir de então (Simeone et al., 1998). O mecanismo molecular pelo qual os genes atuam não é conhecido, mas sabe-se que algumas de suas funções são exercidas graças à capacidade de controlar fatores de transcrição em células embrionárias. Desta forma, os genes *OTX* controlam o ciclo celular e a formação dos tecidos embrionários (Boncinelli et al., 2001). Estes autores descrevem também o papel do gene *OTX2* no controle de mecanismos que envolvem os ritmos circadianos, não somente de sono-vigília, mas de hierarquização temporal da formação dos tecidos. Adicionalmente, explanam o controle do gene *OTX2* sobre a proteína Wnt5, interagindo, desta forma, com a via WNT e agindo sobre moléculas de adesão.

Acredita-se que o gene *OTX1*, tenha papel tão importante quanto a do *OTX2*, e que além de contribuir na embriogênese, atua de forma harmônica e acoplada ao gene *OTX2*, controlando sua expressão e ação biológica (Frantz et al, 1994; Kimura et al, 2005; de Haas et al, 2006). Autores como Simeone (1998) e Acampora (2003) descrevem o papel do gene *OTX1* como

regulador da atividade do gene *OTX2* em algumas fases da embriogênese e como marca-passo em outras fases, determinando o ritmo de formação das camadas cerebelares. O gene *OTX1* estaria envolvido, por exemplo, na formação das células granulares do cerebelo, enquanto o gene *OTX2* estaria envolvido na formação da matriz germinativa periventricular cerebelar. Com tal importância na replicação celular e formação de tecidos, especialmente o cerebelar, compreende-se facilmente que mutações nestes genes, especialmente no *OTX2*, podem levar a malformações das vias ópticas e telencefálicas (como a Holoprosencefalia) e também a tumores, entre eles o meduloblastoma (Michiels et al., 1999; Boon et al., 2003 e 2005; Hever et al., 2006; Eberhart et al., 2007; Briggs et al., 2008). Neste contexto, postula-se que o gene *OTX2* é essencial tanto para a gênese tumoral como para a sua proliferação e manutenção, já que altera definitivamente o perfil celular. Tal afirmação é corroborada pela evidência de seu potencial oncogênico, através do aumento da expressão de *cMyc* que acompanha proporcionalmente a expressão deste gene (Boncinelli et al., 2001).

Os genes *OTX1* e *OTX2* provavelmente também são determinantes na topografia tumoral. Em 2006, de Hass et al. publicam um artigo mostrando a correlação entre expressão dos genes *OTX1* e *OTX2*, com a localização tumoral: os meduloblastomas *OTX2* positivos desenvolvem-se preferencialmente no vérmis cerebelar (proveniente provavelmente de células da matriz periventricular) e em crianças, enquanto os meduloblastomas *OTX2* negativos desenvolvem-se preferencialmente nos hemisférios cerebelares e nos extremos de idade (provenientes

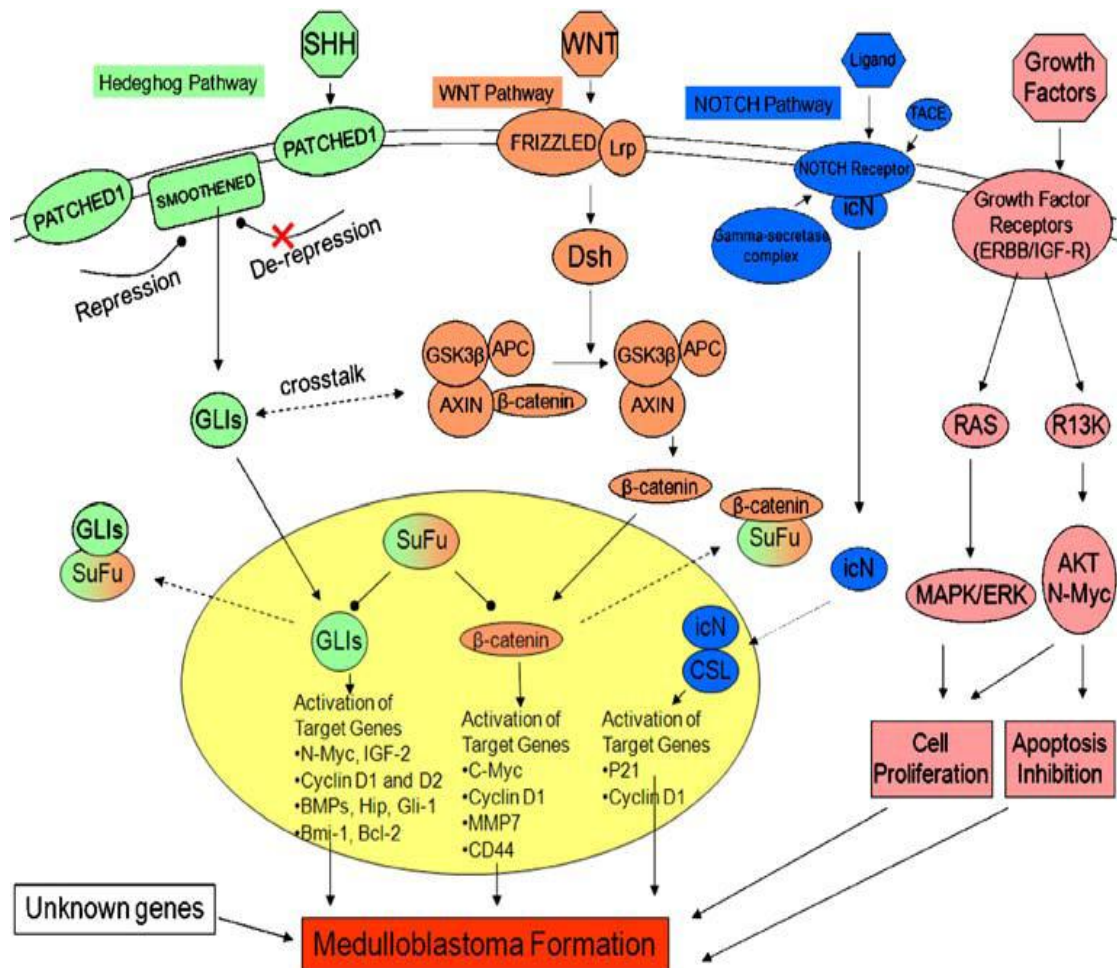
provavelmente das células granulosas, cuja hierarquização é dada de forma mais importante pelo gene *OTX1*). Tal artigo não contém grande riqueza de dados clínicos, porém demonstra um dado interessante: a expressão do gene *OTX2* em 78% dos pacientes com meduloblastomas clássicos, dado até hoje não claramente reproduzido na literatura.

A importância atribuída aos genes *OTX1* e *OTX2* não se encerra, porém, na descoberta de seus envolvimento na tumorigênese. A inibição de suas expressões pelo ácido transretinóico também é fato de grande relevância. Autores como Simeone et al.(1995); Bobola et al.(1999); Hinman et al.(2000); Gumireddy et al.(2003), já haviam descrito a supressão da expressão do gene *OTX2* pelo ácido transretinóico, e a conseqüente não formação do Sistema Nervoso Central em embriões murinos. Em 2005, Di et al. publicaram um trabalho de grande impacto: através de cariotipagem digital, detectaram a amplificação do gene, descrito como *OTX2*, em cerca de 10 vezes em amostras de meduloblastomas anaplásicos, e tais achados foram detectados em 14 de suas 15 amostras. Tais amostras foram cultivadas e submetidas à ação do ácido retinóico, in vitro, em doses farmacológicas. Observou-se que nestas amostras tumorais houve dramática diminuição da expressão do gene *OTX2*, além de indução de apoptose. Tal constatação fomenta a perspectiva do uso do gene *OTX2* como alvo terapêutico, e do ácido retinóico como arma terapêutica no tratamento dos meduloblastomas. Autores como Halilagic et al.(2007); Chang et al.(2007), reforçam os achados de Di C e sugerem o uso do ácido transretinóico como possibilidade terapêutica no tratamento dos

meduloblastomas. Atualmente, desenvolvem-se estudos de Fase III tendo o ácido transretinóico com uma das drogas para o tratamento de resgate de meduloblastomas recidivados. (<http://clinicaltrials.gov>).

### **1.2.5 A intersecção das vias tumorigênicas**

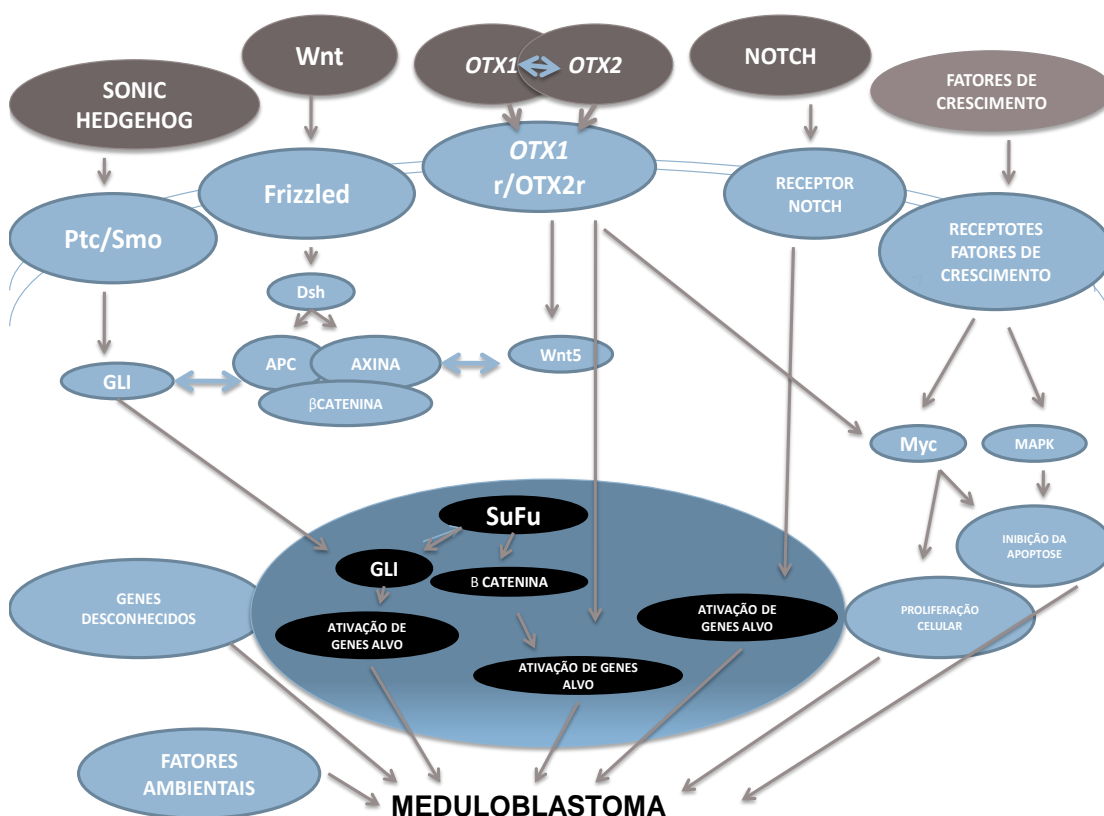
Desde as descrições iniciais das vias tumorigênicas envolvidas nos meduloblastomas, vários autores estudaram as intersecções entre as mesmas (Moon et al.,2002; Kalderon 2002; Nusse et al.,2003; Han et al., 2005; Katoh et al. 2007e 2009; Yang et al., 2008; Danesin et al., 2009; Joksimovic et al., 2009). Em 2008, Carlotti et al., em minucioso trabalho de revisão, propuseram um diagrama de tumorigênese para os meduloblastomas, apresentando não somente a via Wnt como também a Shh e suas interações. Neste diagrama, Carlotti ilustra as interações da via Hedgehog com a via Wnt através de dois ramos: o primeiro, através das inter-relações da proteína Gli (via Hedgehog) com o complexo axina- $\beta$  catenina (via WNT); o segundo, através da proteína SuFu, que controla a ação da proteína Gli (via Hedgehog) e da  $\beta$  catenina (via WNT). O autor inclui também a ação da via NOTCH, a influência dos fatores de crescimento, e a participação de genes ainda não descritos na tumorigênese. Carlotti et al., mostraram, com tal esquema, que várias vias tumorigênicas podem coexistir em um clone de meduloblastoma, sendo ativadas ou silenciadas, em conjunto ou isoladamente, em momentos diferentes do desenvolvimento da doença.



**Figura 7:** Diagrama demonstrando as principais vias tumorigênicas envolvidas no meduloblastoma (Carlotti et al., 2008).

Sob o exemplo do diagrama de Carlotti et al., e com as funções propostas por Boncinelli, propomos o diagrama abaixo, incluindo fatores ambientais (embora desconhecidos) como potenciais promotores de gênese do meduloblastoma, e os genes *OTX1* e *OTX2*. Observa-se a intersecção das vias *OTX1* e *OTX2* com a via Wnt através do fator Wnt5, seu controle inibidor sobre o gene Myc e sua hipotética ação direta no núcleo celular. A

interação do gene *OTX1* com as outras vias tumorigênicas ainda é pouco conhecida, mas provavelmente ocorre de forma indireta através da sinalização do gene *OTX2*. Da mesma forma, não se conhece o mecanismo de expressão do gene *OTX2* nos pacientes com meduloblastomas: se ele não é silenciado após a nona semana de vida; ou se é silenciado, e por mecanismos desconhecidos, readquire seu potencial de expressão e se envolve na tumorigênese.



**Figura 8:** Esquema modificado de Carlotti et al., expondo os diversos mecanismos tumorigênicos, e a inclusão dos genes *OTX1* e *OTX2* neste esquema.



### 1.3 A seleção dos genes

De acordo com os dados apresentados anteriormente, optou-se por estudar na presente tese os genes *OTX1* e *OTX2* pelos seguintes motivos:

- Há evidências que são muito importantes para a gênese dos meduloblastomas.
- São pouco estudados
- Podem ser alvo terapêutico do ácido transretinóico

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

-verificar a prevalência da expressão dos genes *OTX1* e *OTX2* em uma amostra de 60 pacientes.

-correlacionar a expressão gênica com características clínicas, histológicas e topográficas.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODO**

#### **3.1. Casuística**

##### **3.1.1. Dados clínico-epidemiológicos**

Foram selecionados para o presente estudo 60 pacientes com diagnóstico de meduloblastoma, operados no Hospital das Clínicas na Faculdade de Medicina da USP e no Hospital do Câncer de Barretos, no período de 2000 a 2009. Tais pacientes (ou seus responsáveis legais), mediante consentimento informado, permitiram que amostras de fragmentos tumorais obtidos em suas respectivas intervenções cirúrgicas fossem analisadas no Laboratório de Investigação em Neurologia (LIM15), em relação à expressão dos genes *OTX1* e *OTX2*. O projeto de pesquisa em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética deste Hospital (protocolo número 0291/06 e termo de ciência de inclusão de pacientes de 24/02/2010, Anexo 1).

Para cada paciente foi elaborado um prontuário de pesquisa (anexo 2) rigidamente seguido, que compreende os seguintes itens: nome, RGHC (número de registro do hospital), número da lâmina de seu exame anatomopatológico, sexo, idade, sintomas, tempo de evolução da doença, sinais e sintomas, características de imagem do tumor [localização central ou lateral (hemisférica e ângulo ponto cerebelar)], aspecto e peculiaridades, existência de disseminação liquórica (diagnosticada através de métodos de imagem e/ou análise de líquido), tipo de cirurgia, presença de derivação ventrículo-peritonal prévia.

No momento da abordagem cirúrgica, foram observadas características macroscópicas do tumor: invasão de estruturas adjacentes, tamanho, coloração, friabilidade, presença de cistos e calcificações, sangramento (habitual ou normal), plano de clivagem e grau de ressecção. O grau de ressecção foi dado pela impressão do cirurgião, sendo classificado em total, subtotal (maior que 90%), parcial e apenas biópsia. Parte dos fragmentos obtidos através da ressecção tumoral foi encaminhada ao (LIM 15), para os estudos genéticos pertinentes a esta tese.

De forma protocolar, todos os pacientes após a cirurgia foram submetidos à coleta de líquido para pesquisa de células neoplásicas, salvo contra-indicação (hidrocefalia não comunicante, massa tumoral residual de grande volume em fossa posterior). Os pacientes que foram submetidos à derivação ventricular externa tiveram o líquido colhido também do cateter ventricular. Esta coleta de líquido, com as mesmas contra-indicações, também foi realizada durante o acompanhamento clínico do paciente.

Após a cirurgia, foram realizados exames de imagem de controle para corroborar as impressões intra-operatórias (como o grau de ressecção, por exemplo). Todos os pacientes realizaram tomografia pós-operatória imediata. Os pacientes também realizaram Ressonância Magnética pós-operatória. Os que não a realizaram durante a estada hospitalar, o fizeram ambulatorialmente, em um período não superior a dois meses. Toda a evolução pós-operatória do paciente, intercorrências e complicações foram registradas. Foram conferidos e registrados os resultados histopatológicos de cada paciente, obtendo a confirmação de meduloblastoma e seu subtipo

(clássico, desmoplásico, células gigantes, extensa nodularidade ou anaplásico).

Após a cirurgia e recuperação cirúrgica, o paciente foi inserido em protocolos oncológicos recebendo quimioterapia e/ou radioterapia. Foram realizados controles por exames de imagem, e quando indicado, controle liquorico. Todos os dados obtidos são inseridos no prontuário de pesquisa do paciente da presente tese. O paciente foi então acompanhado no ambulatório de Neurocirurgia Infantil e no Grupo de Tumores do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, e no ambulatório de Neurocirurgia do Hospital do Câncer de Barretos, através de consultas periódicas. Foram avaliados quanto à sua qualidade de vida, terapias neoadjuvantes empregadas, resposta terapêutica, complicações e comorbidades, tempo de recidiva e sobrevida. Dados complementares foram obtidos através de entrevista com pacientes ou familiares, ou através de consulta ao prontuário médico.

Em caso de óbito, a *causa mortis* foi registrada.

### **3.2. Metodologia**

Os fragmentos tumorais obtidos durante os procedimentos cirúrgicos de cada paciente foram encaminhados ao LIM15. Cada amostra foi numerada, identificada e protocolada. As amostras tumorais foram resfriadas em Nitrogênio líquido por 30 minutos após a ressecção cirúrgica e armazenadas apropriadamente. Alternativamente, as amostras de tecido foram submersas em agentes estabilizadores de RNA (RNA later, Qiagen) imediatamente

após a sua coleta. Neste reagente as amostras permanecem estáveis por cerca de uma semana a 25°C ou um mês a 4°C.

Para o estudo comparativo (controles não neoplásicos) com o tecido tumoral foram obtidas amostras de tecido cerebelar de pacientes maiores de seis meses mediante consentimento esclarecido. Tais fragmentos de cerebelo foram obtidos em pacientes que foram submetidos à ressecção de parte de tecido cerebelar por doença não neoplásica (como encefalocele, Chiari) em procedimento de rotina. Foi utilizado também um pool comercial (Clontech<sup>®</sup>), de cerebelo não neoplásico de 24 homens e mulheres (idades compreendidas entre 1 e 30 anos).

As amostras foram então processadas para o estudo da expressão dos genes *OTX1* e *OTX2*, que será feita pela técnica de PCR em tempo real. Este processamento das amostras contempla a extração de RNA das amostras tumorais, a obtenção de cDNA, e a reação de PRC em tempo real, onde será observada a expressão dos genes *OTX1* e *OTX2* nas amostras de meduloblastomas.

### **3.2.1. Extração de RNA**

Os tecidos foram analisados em criocorte de 4µm por coloração com hematoxilina-eosina a fim de se verificar a qualidade do tecido. Porções de tecidos não tumorais (tecido normal, necrose) foram dissecados previamente à extração de RNA. O RNA total foi extraído com

Mini Kit RNeasy (Qiagen Inc, Hilden, Germany). A qualidade das amostras foi verificada através de corrida eletroforética em gel denaturante de agarose e as concentrações das mesmas foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 260/280nm no aparelho ND-Spectrophotometer (Nano Drop Technologies, Inc), em que se consideraram satisfatórias razões que variavam de 1,8 a 2,0. As amostras-mãe foram estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e uma alíquota foi utilizada para a transcrição reversa.

### 3.2.2. Transcrição Reversa

Para cada 7,0  $\mu\text{l}$  ( $2\mu\text{g}$ ) de RNA a ser reversamente transcrito, acrescentou-se 0,2 $\mu\text{L}$  de DNase , 0,3 $\mu$  de água MilliQ, 2,0 $\mu\text{L}$  do tampão de síntese 5X (*First Strand Buffer*, Invitrogen) e 0,5 $\mu\text{L}$  de inibidor de RNase (RNase out, Invitrogen). Este produto foi incubado por 10 min a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  e por 5 min a temperatura de  $75^{\circ}\text{C}$ .

A seguir, foram adicionados a cada amostra 0,09 $\mu$  de *Random Primers* (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; Invitrogen), 0,5  $\mu\text{L}$  de Oligo dT (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ; Invitrogen), 1,0  $\mu$  de solução com mistura de dNTPs (10mM; Invitrogen) e 0,41 $\mu\text{L}$  de água MilliQ. Em seguida, as amostras foram incubadas por mais 10 min a temperatura de  $75^{\circ}$ .

Ao final deste processo, as amostras foram imediatamente resfriadas (etapa realizada no gelo) e foram acrescentados a cada amostra 2,0 $\mu\text{L}$  do tampão de síntese 5X (*First Strand Buffer*, Invitrogen), 1,0 $\mu\text{L}$  de DTT 0,1M

(Invitrogen), 0,5µL do inibidor RNase, 3,5µL de água MilliQ e 1,0µL de transcriptase reversa (Superscript III,Invitrogen® CA-USA) . As amostras foram homogeneizadas e novamente incubadas por 5 minutos a temperatura de 25°C, 60 minutos a 50°C, e 15 min a 70°C. Após esta etapa, as amostras foram eluídas em TE-4 e armazenadas a -20°C.

### 3.3.4. PCR quantitativo em tempo real

Amostras de cDNA foram agrupadas em uma casuística total de 4 tecidos cerebelares não tumorais e 60 meduloblastomas para o estudo dos genes *OTX1* e *OTX2*.

A seleção dos genes controles ou de referência endógena foi realizada segundo os critérios que incluem: níveis de expressão semelhantes em diferentes tipos celulares, ausência de comprometimento do gene com o ciclo celular ou ativação celular e estabilidade comparável aos demais genes do estudo. Os dados quantitativos referentes à análise de expressão na casuística foram normalizados relativamente à média geométrica de três genes endógenos: hipoxantina fosforibosiltransferase(HPRT), glucoronidase beta(GUSB) e proteína reativa binding cassette da subfamília G(BCRP).

As reações foram realizadas em duplicatas, perfazendo um volume total de 12 µl, sendo 6µ de “SYBR Green master Mix” (Applied® Biosystems), 3 µl de cDNA e 3µl de *primers*. A amplificação compreendeu as etapas de incubação por 5 minutos a 50°C, desnaturação inicial por 10 minutos a 95°C,



seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60° por 60 segundos, correspondendo ao tempo de anelamento dos *primers* e extensão. Ao final de todas as reações, conferiram-se as curvas de dissociação com temperaturas gradativamente crescentes a fim de se verificar a amplificação de um único produto. Tais reações foram realizadas em aparelho ABI Prism 7500(Applied Biosystems). As reações foram repetidas quando os valores de CT ultrapassaram um desvio padrão de 0,4. Os *primers* para a expressão gênica foram desenhados em exons diferentes para evitar amplificações de DNA genômico, e a formação de dímeros. A síntese foi realizada pela MWG (Biotech AG, Ebersberg, Alemanha) ou IDT (Coralville, IA, EUA) para a amplificação de produtos de 80 a 140 pb. A amplificação de um único produto foi confirmada através de suas curvas de dissociação. Os produtos de PCR também foram checados por eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio, para a confirmação da amplificação correta do produto. Para cada reação foram testadas concentrações finais de *primers* mínimas que não prejudicassem a eficiência da reação. Como procedimento padrão, para cada gene foram testadas concentrações de primers nas reações, 200nM, 400nM 600nM. A eficiência de amplificação foi calculada através da utilização de diluições seriadas de um *pool* de cDNA de meduloblastomas. A fórmula utilizada para verificar a eficiência da amplificação foi  $(E=10^{(-1/-slope)}-1)$ . A seqüência de primers utilizada está descrita na tabela a seguir:

**Tabela 4:** Primers utilizados nas reações de PCR em tempo real

GENE	PRODUTO DE PCR	SEQUENCIA FOWARD (5'-3')	SEQUENCIA REVERSE (5'-3')
<i>OTX1</i>	109pb	CAATCACCTAAACAACC AGCA	GGGCCGTTCCACCATCTACCT
<i>OTX2</i>	107pb	AGACCCGGTACCCAGACATCTT	GCGGCACTTAGCTCTTCGATT
<i>HPRT</i>	104pb	TGAGGATTTGGAAAGGGTG	GAGCACACAGAGGGCTACAA
<i>GUSβ</i>	102pb	GAAAATACGTGGTGGAGCTCAAT	CCGACTGAAGATCCCCTTTTAA
<i>BCRP</i>	106pb	CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT	CCTGCGATGGCGTTCAC

A equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , foi aplicada no cálculo da expressão relativa gênica para  $E = 100 \pm 10\%$ , onde  $\Delta Ct = Ct_{OTX1}$  (ou  $OTX2$ ) - (média geométrica  $\Delta Ct$  *HPRT*, *GUSβ* e *BCRP*); e  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tumoral}$  - média  $\Delta Ct$  cerebelos não neoplásicos (Livak et al., 2001).

Foram então obtidas curvas de amplificação, e obtidos os valores relativos à expressão tumoral. Tais dados foram colocados em tabela e comparados com a expressão de gene tecido cerebelar não neoplásico.

#### 3.4.5. Análise da expressão dos genes *OTX1* e *OTX2*

A análise dos resultados foi feita através da quantificação relativa da expressão dos genes *OTX1* e *OTX2* em comparação com as amostras de tecido cerebelar não neoplásico. Após a determinação destes valores, foi atribuída a classificação de “expressa o gene” ou “não expressa o gene” para cada amostra. Os pacientes foram então classificados em quatro perfis

de expressão gênica: os que expressam apenas o gene *OTX1*(*OTX1+* *OTX2-*), os que expressam apenas o gene *OTX2*(*OTX1-OTX2+*), os pacientes que expressam ambos (*OTX1+* *OTX2+*), e os pacientes que não expressam nenhum dos genes (*OTX1-* *OTX2-*).

Estes perfis de expressão gênica foram comparados com os perfis fenotípicos e clínicos da amostra.

### **3.5. Análise estatística dos dados**

A análise estatística de todas as informações coletadas nesta pesquisa foi inicialmente feita de forma descritiva. Para as variáveis de natureza quantitativa (numérica) foram calculadas determinadas medidas-resumo, como média, mediana, valor mínimo, valor máximo, desvio-padrão (Bussab e Morettin, 2006). As variáveis de natureza qualitativa (categorizada) foram analisadas através do cálculo de frequência absoluta e relativa (porcentagem) (Bussab e Morettin, 2006).

As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 15.0 for Windows e R-Program versão 2.10.1.

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram inicialmente os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, para determinação da natureza da amostra, com  $p < 0,05$ . Para os cálculos de associação entre expressão gênica e idade, tipo histológico, topografia e associação com

metástases foram realizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis. Testes como o Qui-quadrado de Pearson, teste Exato de Fisher ou sua extensão (Agresti, 1990) também foram utilizados para efeitos comparativos. Estimação das curvas de Kaplan-Meier (Collett, 2003) e teste de Log-rank (Collett, 2003) para investigar o comportamento individual do tempo de sobrevida (meses) dos indivíduos, segundo faixa etária ao diagnóstico, tipo histológico do tumor, local da massa tumoral, expressão do gene *OTX1* e *OTX2*. Foi ainda realizado teste de regressão de Cox para exclusão das variáveis de confusão das curvas de Kaplan-Meier.

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância  $\alpha$  igual ou menor a 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características clínicas

A casuística compreendeu com 60 pacientes, sendo 23 (38,3%) do gênero feminino e 37 (61,7%) do gênero masculino. As idades variaram de 8m a 48 anos e 2m à época do diagnóstico. O grupo feminino tinha, em média, idade ao diagnóstico de 12,2 anos, variando de 8 meses a 36 anos e 1 mês, com desvio-padrão de 10,8 anos. O grupo masculino tinha, em média, idade ao diagnóstico de 18,6 anos, variando de 1 ano e 8 meses a 48 anos e 2 meses, com desvio-padrão de 12,2 anos. Para estudo das características relacionadas à idade, os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com sua faixa etária: de zero a três anos, de três anos e um dia a 18 anos, e maiores de 18 anos. Tal estratificação está justificada por estudos prévios que mostram diferenças entre características clínicas e prognósticas entre as diferentes faixas etárias (Abocioglu et al., 2002; Akay et al. , 2004; Brandes et al., 2007 Ang et al. 2008). Com tal estratégia, planejou-se identificar características epidemiológicas e genéticas distintas entre os grupos. Para a classificação de adultos e crianças, foram utilizados os conceitos do Estatuto da Criança e do Adolescente (Ishida et al., 2010) e da Organização Mundial da Saúde, que identificam como adulto o indivíduo maior que 18 anos de idade. Após a estratificação, obteve-se 7 pacientes com idade entre 0 e 3 anos (11,7%); 31 entre 3 anos e 1 dia a 18 anos (51,7%), e 22 pacientes maiores que 18 anos (36,7%).

Os principais sintomas iniciais foram cefaléia, presente em 72% dos pacientes, incoordenação em 62% dos pacientes, e náuseas e vômitos em 40%. Quarenta e cinco pacientes apresentavam massas tumorais em vérmis e 15 pacientes em hemisfério cerebelar, por vezes mimetizando outros tumores, como meningiomas. Hidrocefalia foi um achado comum, observada em em 51 pacientes (85%). Entre estes 51 pacientes, 60% do necessitou de derivação ventriculoperitoneal ao longo da sua evolução clínica. Em relação aos aspectos cirúrgicos, o índice de ressecção total e subtotal foi da ordem de 93%, parcial e biópsia da ordem de 7%. Três casos foram descritos com anormalmente sangrantes e cinco como “aspecto de meningioma”. Estes últimos foram classificados posteriormente como meduloblastomas desmoplásicos. O tipo histológico mais comum foi o clássico, diagnosticado em 39 pacientes (65%), seguido pelo tipo desmoplásico em 11 pacientes (18,3%); células gigantes em 6 pacientes (10%), extensa nodularidade em 3 casos (5,0%) e um anaplásico (1,7%).

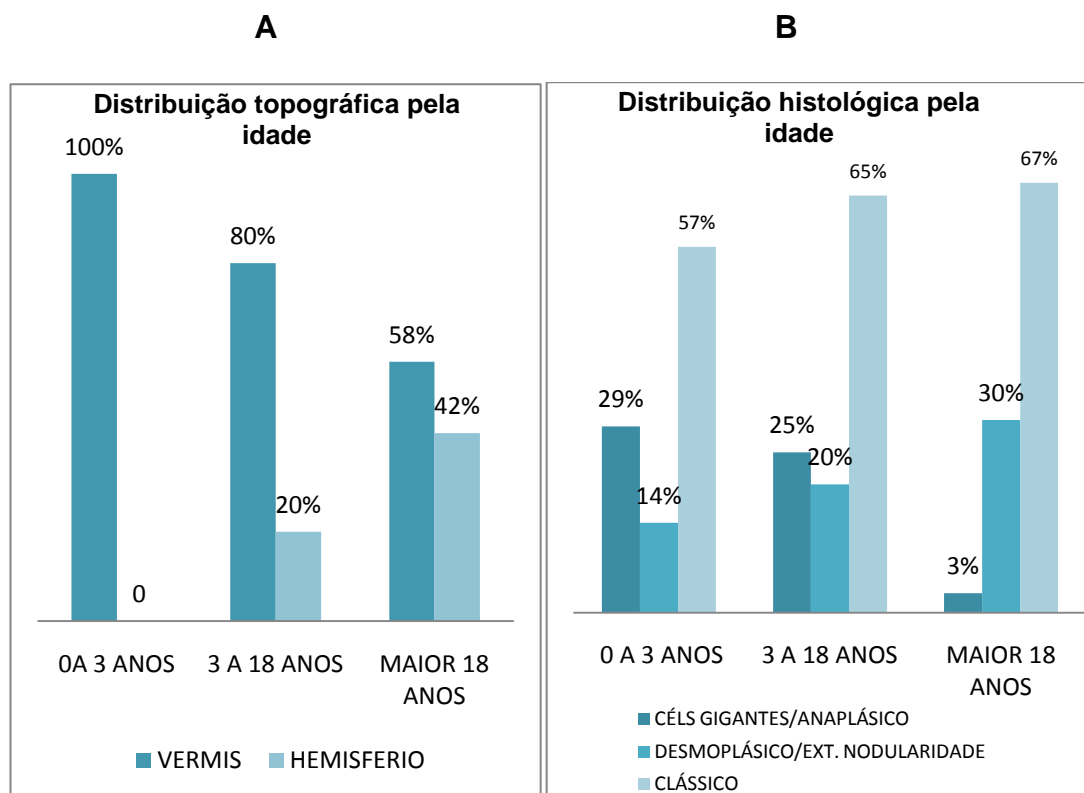
Nove pacientes apresentavam disseminação leptomeníngea ao momento do diagnóstico. Dois destes apresentavam tumores hemisféricos, e sete, vermianos. As variantes histológicas para este grupo foram o tipo clássico, em 5 casos, desmoplásico em 3 casos e células gigantes em 01 caso. Radioterapia foi administrada em todos os pacientes, exceto crianças menores de três anos (por contra-indicação clínica consagrada), e quimioterapia também foi administrada em todos os pacientes. Esta última modalidade foi intermitente em 9 pacientes, que apresentaram contra-indicações clínicas, como infecção.

O seguimento variou de 0 a 144 meses, com média de 35 meses, e desvio padrão de 3 meses. Quinze pacientes (25%) apresentaram disseminação leptomenígea ao longo de sua evolução e um paciente apresentou disseminação extraneural. Este último não havia sido submetido à derivação ventriculoperitoneal, e apresentou metástases em ossos, linfonodos, medula óssea e pleura.

O período para recidiva (levando-se em consideração RNM livre de doença) da doença, que ocorreu em 16 pacientes, variou de 6 meses a 96 meses, com média de 27 meses. Cinco pacientes foram reoperados e dois deles foram submetidos a outras 02 reoperações. A principal *causa mortis* foi a disseminação da doença, seguida por causas infecciosas.

Os gráficos a seguir (Figura 9) mostram a distribuição da topografia tumoral (vermiana ou hemisférica) e dos tipos histológicos nas diferentes faixas etárias. No primeiro gráfico (Figura 9 A) nota-se o a localização vermiana exclusiva nas crianças de 0 a 3 anos de idade. A frequência da localização vermiana cai na faixa etária de 3 a 18 anos (80%), e de forma mais acentuada, na faixa etária de maiores de 18 anos (58%). A frequência da localização topográfica hemisférica apresenta comportamento inversamente proporcional à topografia vermiana: ela aumenta de acordo com a faixa etária. A localização vermiana, porém, foi a mais prevalente em todas as faixas etárias. No segundo gráfico (Figura 9 B) observa-se a distribuição dos diferentes tipos histológicos de meduloblastomas (clássico, desmoplásico, extensa nodularidade, células gigantes e anaplásico), pelas faixas etárias. Nota-se o predomínio da variante clássica nas crianças de 0 a

3 anos de idade, correspondendo a 57% dos tumores desta faixa etária. A frequência da variante clássica aumentou de forma discreta de acordo com o aumento da idade, representando 65% dos tumores na faixa de 3 a 18 anos, e 67% na faixa maior de 18 anos. A frequência da variante desmoplásica aumentou de forma marcante com a idade. Em crianças de 0 a 3 anos, esta variante representa apenas 14% dos tumores. Na faixa dos 3 a 18 anos, esta porcentagem sobe para 20%, e entre os adultos, para 30%. A variante células gigantes/ anaplásica diminuiu com o aumento da faixa etária. Analisando estes gráficos conjuntamente, observa-se a tendência de crianças de 0 a 3 anos com tumores vermianos e clássicos, e adultos com tumores hemisféricos e desmoplásicos.



**Figura 9:** Gráficos da distribuição, em porcentagem, da topografia tumoral (em A) por faixa etária, e dos tipos histológicos (em B) do tumor por faixa etária.



A seguir, são apresentadas na tabela, as medidas de sobrevida que serão utilizadas para os cálculos estatísticos para os diferentes grupos de idade, topográfico e histológico. Para tais cálculos, foi excluído um paciente que evoluiu a óbito no período perioperatório.

**Tabela 5:** Medidas-resumo do tempo de sobrevida (meses) segundo a faixa etária ao diagnóstico, tipo histológico do tumor e local da massa tumoral.

<b>Faixa etária ao diagnóstico</b>	<b>status</b>	<b>N</b>	<b>média</b>	<b>mediana</b>	<b>mínimo</b>	<b>máximo</b>	<b>desvio-padrão</b>
<b>0 a 3 anos (7)</b>	óbito	6	14,5	15,0	6,0	24,0	6,7
	vivo	1	8,0	8,0	8,0	8,0	.
	Total	7	13,6	12,0	6,0	24,0	6,6
<b>3 a 18 anos (30)</b>	óbito	12	23,8	15,0	1,0	96,0	26,9
	vivo	18	46,8	45,0	6,0	96,0	24,3
	Total	30	37,6	30,0	1,0	96,0	27,4
<b>acima de 18 anos (22)</b>	óbito	9	35,2	24,0	1,0	144,0	45,0
	vivo	13	45,3	46,0	6,0	96,0	32,8
	Total	22	41,2	24,5	1,0	144,0	37,6
<b>Tipo histológico do tumor</b>	<b>status</b>	<b>N</b>	<b>média</b>	<b>mediana</b>	<b>mínimo</b>	<b>máximo</b>	<b>desvio-padrão</b>
<b>Anaplásico (1)</b>	óbito	1	96,0	96,0	96,0	96,0	.
	vivo						
	Total	1	96,0	96,0	96,0	96,0	.
<b>Células gigantes (6)</b>	óbito	5	10,8	9,0	1,0	24,0	10,0
	vivo	1	86,0	86,0	86,0	86,0	.
	Total	6	23,3	13,5	1,0	86,0	32,0
<b>Clássico (39)</b>	óbito	18	20,1	15,0	1,0	54,0	16,9
	vivo	21	42,9	31,0	6,0	96,0	26,5
	Total	39	32,4	24,0	1,0	96,0	25,1
<b>Desmoplásico (11)</b>	óbito	3	59,3	20,0	14,0	144,0	73,4
	vivo	8	39,4	43,0	6,0	81,0	28,4
	Total	11	44,8	40,0	6,0	144,0	41,6
<b>Extensa nodularidade (2)</b>	óbito						
	vivo	2	69,0	69,0	42,0	96,0	38,2
	Total	2	69,0	69,0	42,0	96,0	38,2
<b>Topografia tumoral</b>	<b>status</b>	<b>N</b>	<b>média</b>	<b>mediana</b>	<b>mínimo</b>	<b>máximo</b>	<b>desvio-padrão</b>
<b>Hemisfério (15)</b>	óbito	8	40,9	30,0	1,0	144,0	46,0
	vivo	7	42,6	40,0	6,0	81,0	32,9
	Total	15	41,7	40,0	1,0	144,0	39,0
<b>Vermis (44)</b>	óbito	19	19,1	12,0	1,0	96,0	21,8
	vivo	25	45,6	46,0	6,0	96,0	27,3
	Total	44	34,2	24,0	1,0	96,0	28,1

Foram também comparados os dados de sobrevida dos pacientes que apresentaram disseminação leptomeníngea. As tabelas a seguir mostram as medidas de sobrevida que foram utilizadas para comparar os pacientes que apresentaram disseminação leptomeníngea inicial, e ao longo da doença.

**Tabela 6:** Medidas-resumo do tempo de sobrevida (meses) dos indivíduos, segundo presença de disseminação ao diagnóstico inicial da doença.

Disseminação inicial		N	média	mediana	mínimo	máximo	desvio-padrão
com disseminação inicial	morto	5	11,80	9,00	6,00	20,00	6,72
	vivo	4	15,75	14,00	6,00	29,00	10,78
	Total	9	13,56	9,00	6,00	29,00	8,40
sem disseminação inicial	morto	22	28,68	18,00	1,00	144,00	34,29
	vivo	28	49,14	48,00	6,00	96,00	27,30
	Total	50	40,14	28,50	1,00	144,00	31,93

**Tabela 7:** Medidas-resumo do tempo de sobrevida (meses) dos indivíduos, segundo presença de disseminação leptomeníngea

Exames evolutivos		N	média	mediana	mínimo	máximo	desvio-padrão
com disseminação	morto	12	34,42	19,00	2,00	144,00	39,14
	vivo	3	28,00	20,00	6,00	58,00	26,91
	Total	15	33,13	20,00	2,00	144,00	36,25
sem disseminação	morto	15	18,47	12,00	1,00	96,00	23,12
	vivo	29	46,72	46,00	6,00	96,00	28,01
	Total	44	37,09	24,50	1,00	96,00	29,47

Para a verificação da hipótese de que a idade ao diagnóstico representa diferenças na sobrevida dos pacientes, foi elaborada curva de Kaplan Meier comparando as diferentes faixas etárias. Embora se observe uma forte tendência a maior sobrevida entre os adultos, a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ( $p=0,864$ ), como pode ser verificado na curva de Kaplan Meier (Figura 10 A).

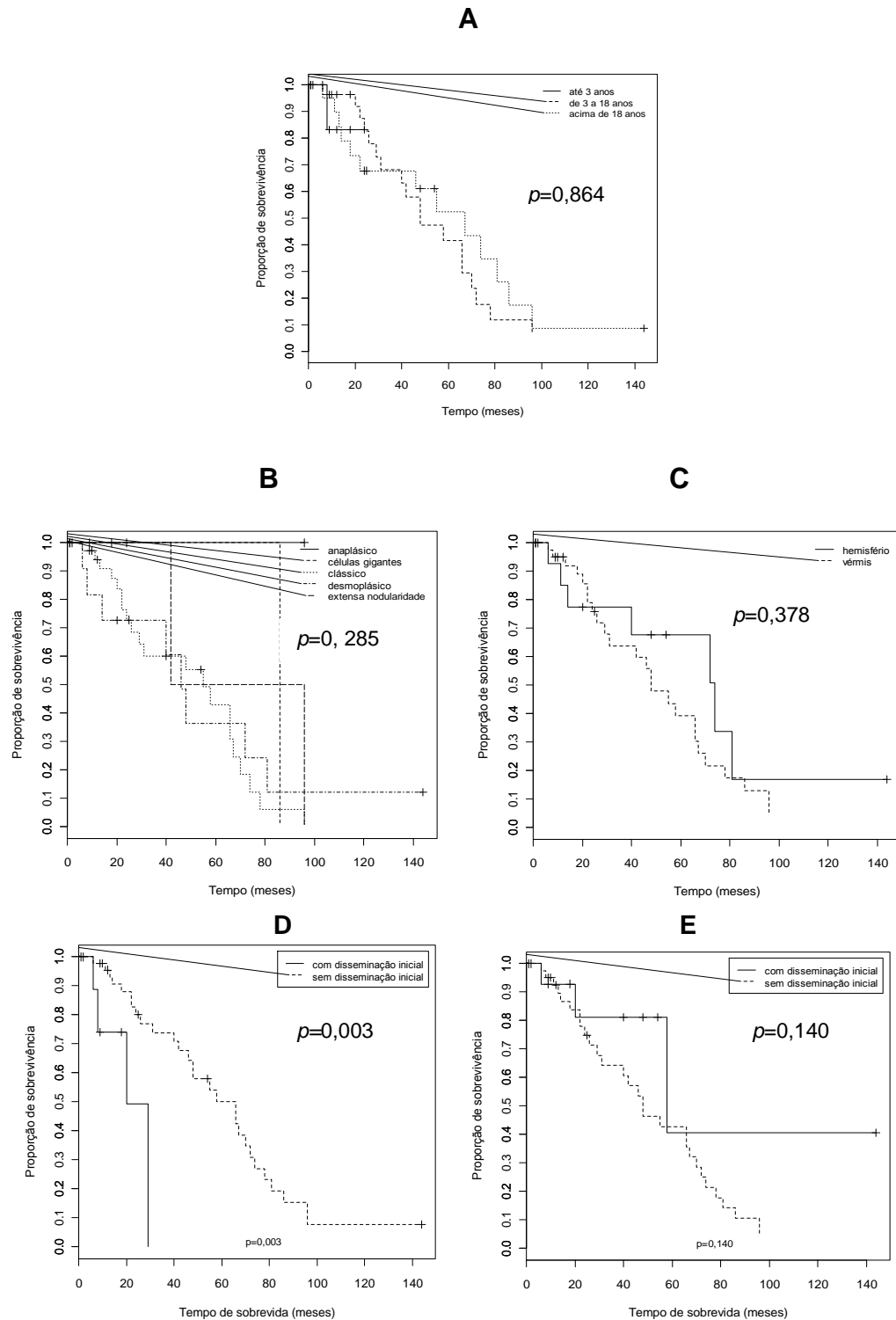
Em relação às curvas de sobrevida para os diferentes tipos histológicos (clássico, desmoplásico, extensiva nodularidade, células gigantes e anaplásico), observa-se uma tendência, embora sem significância estatística, de maior sobrevida entre os pacientes com tumores desmoplásico ( $p=0,285$ ), como pode ser verificado na curva de Kaplan Meier (Figura 10 B).

Analogamente aos parâmetros anteriores, também não foi observada diferença estatisticamente significante entre as curvas de sobrevida dos pacientes com tumores hemisféricos e com tumores vermianos ( $p=0,378$ ), como pode ser observada na curva de Kaplan Meier (Figura 10 C). Houve, porém, uma tendência a maior sobrevida em pacientes com tumores de topografia hemisférica.

Foi também feita a comparação entre as curvas de sobrevida entre indivíduos que apresentaram disseminação inicial da doença e os que não apresentaram. Os resultados da comparação entre as curvas de sobrevida, pelo teste de Log-Rank, revelaram que a sobrevida dos indivíduos que apresentaram disseminação inicial é estatisticamente menor que a sobrevida dos indivíduos que não apresentaram disseminação inicial ( $p=0,003$ ).

Em relação à disseminação ao longo do curso clínico da doença, a sobrevida dos indivíduos que apresentaram disseminação ao longo de sua evolução é estatisticamente a mesma dos indivíduos que não apresentaram disseminação ( $p=0,140$ ).

As curvas de Kaplan Meier referentes aos dados citados podem ser observadas a seguir (figura 10):

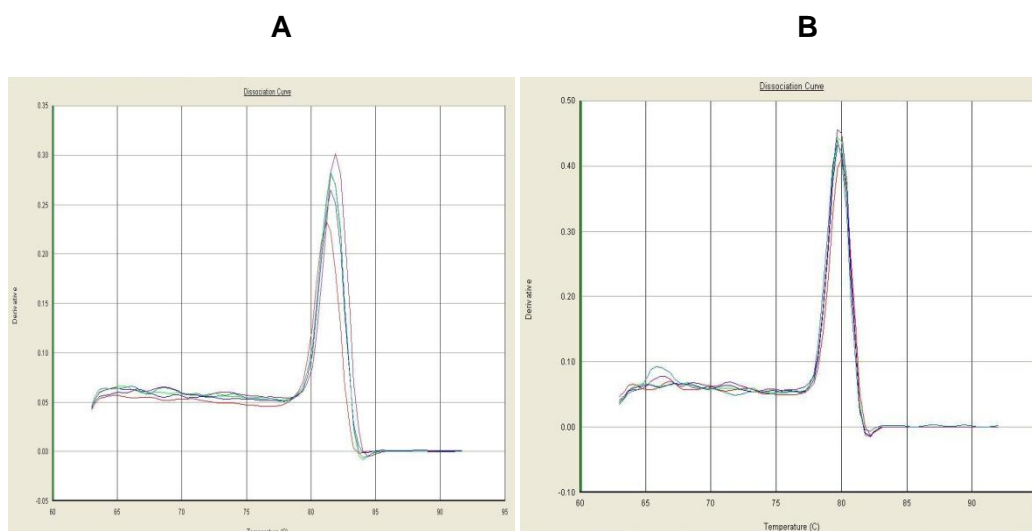


**Figura 10:** curvas de Kaplan Meier para comparação de sobrevida dos diferentes grupos: em A, curvas de sobrevida pela faixa etária; em B, curva de sobrevida pelo tipo histológico; em C, curva de sobrevida para topografia tumoral; em D curvas de sobrevida em relação à disseminação leptomeníngea inicial; em E, curva de sobrevida para disseminação leptomeníngea ao longo da evolução.

## 4.2. PCR quantitativo em tempo real

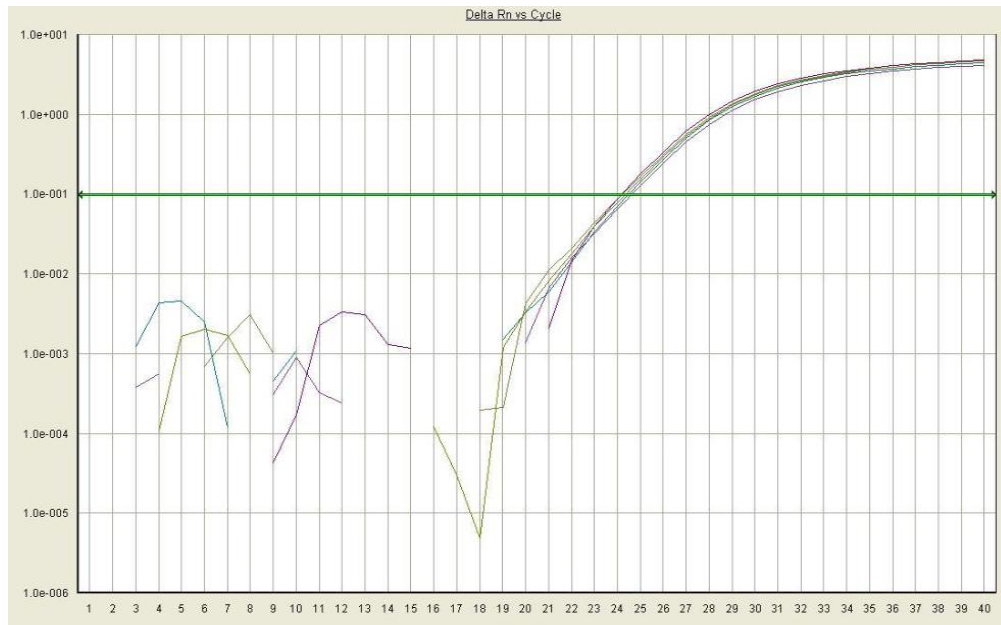
Os níveis de expressão dos genes *OTX1* e *OTX2*, e dos genes de referência endógenos *HPRT*, *GUS $\beta$*  e *BCRP* foram quantificados através de técnica de PCR em tempo real nos 60 casos de meduloblastomas, em 03 cerebelos não neoplásicos e no pool de cerebelo comercial previamente citado.

Foram desenhadas, então, curvas de dissociação dos produtos de PCR dos genes *OTX1* e *OTX2* para verificação da qualidade da reação e eventuais contaminações, formação de dímeros de *primers* e amplificações sem especificidade. Os produtos resultantes (produtos de PCR) foram verificados em relação à sua amplificação e tamanho esperado. As reações de amplificação com diluições seriadas dos primers foram utilizadas para o cálculo da eficiência de amplificação através das curvas padrão. As figuras a seguir expõem as curvas de dissociação dos genes *OTX1* e *OTX2*.

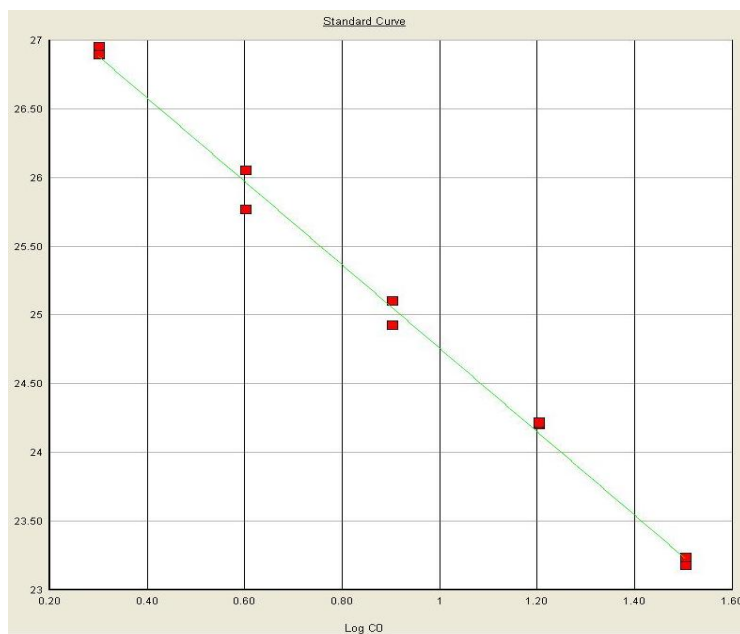


**Figura 11:** Curva de dissociação dos produtos de PCR em tempo real do gene *OTX1* (em A) e *OTX2* (em B).

A



B



$$R^2=0,99$$

$$\text{SLOPE } -3,0300$$

$$E=10^{(-1/\text{slope})}-1=1,138$$

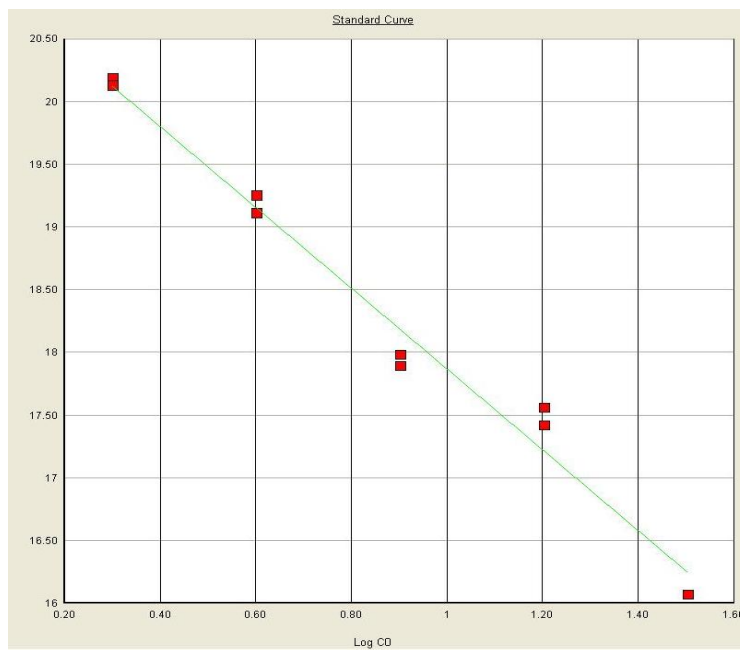
$$\text{EFICIÊNCIA } 113\%$$

**Figura 12** :Curva de amplificação do gene *OTX1*(em A) e a respectiva curva de eficiência (em B).

A



B



$$R^2=0,97$$

$$\text{SLOPE } -3,44$$

$$E=10^{(-1/\text{slope})}-1=0,953$$

$$\text{EFICIÊNCIA } 95\%$$

**Figura 13** :Curva de amplificação do gene *OTX2*(em A) e a respectiva curva de eficiência (em B).

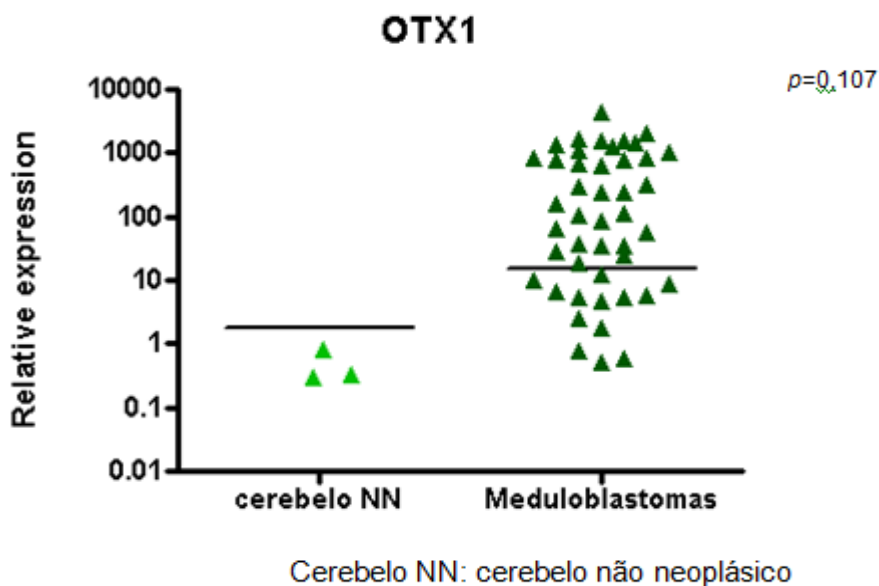
Para cada gene, foi então estabelecido parâmetro de expressão. Para o gene *OTX1*, a amostra com expressão relativa maior que 1 foi considerada positiva para a expressão do gene. Amostras com valor menor a 1 foram consideradas negativas para a expressão do gene *OTX1*. Para o gene *OTX2*, a amostra com expressão relativa maior que 2 foi considerada positiva para a expressão do gene. Amostras com valor menor a 2 foram consideradas negativas para a expressão do gene *OTX2*.

Os valores obtidos foram submetidos aos os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, para determinação da natureza da amostra, com  $p < 0,05$ . Tais testes estabeleceram distribuição não normal, indicando assim a realização de testes não paramétricos. (Mann Whitney e Kruskal Wallis), que serão apresentados a seguir.

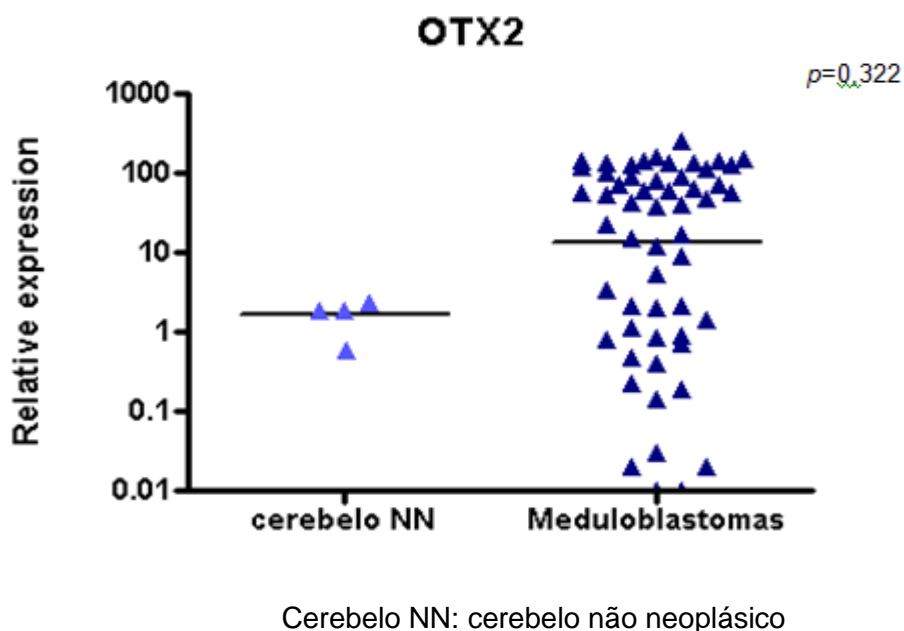
#### **4.3. Expressão dos genes *OTX1* e *OTX2***

A expressão do gene *OTX1* foi positiva em 31 (52%) dos pacientes. A expressão do gene *OTX2* foi positiva em 37 (62%) dos pacientes. Com a obtenção dos dados da reação de PCR em tempo real, foram elaborados gráficos que descrevem a expressão relativa dos genes *OTX1* e *OTX2* em relação a tecido cerebelar, que podem ser observados a seguir.





**Figura 14:** Gráfico da expressão relativa do gene *OTX1* mostrando a expressão do gene em relação ao cerebello normal. Não houve diferença estatística entre o total de amostras de meduloblastoma e os tecidos cerebelares não neoplásicos ( $p=0,107$ ).



**Figura 15:** Gráfico da expressão relativa do gene *OTX2* mostrando a expressão do gene em relação ao cerebello normal. Não houve diferença estatística entre o total de amostras de meduloblastoma e os tecidos cerebelares não neoplásicos ( $p=0,322$ ).

#### 4.4. Correlação fenótipo-nível de expressão gênica

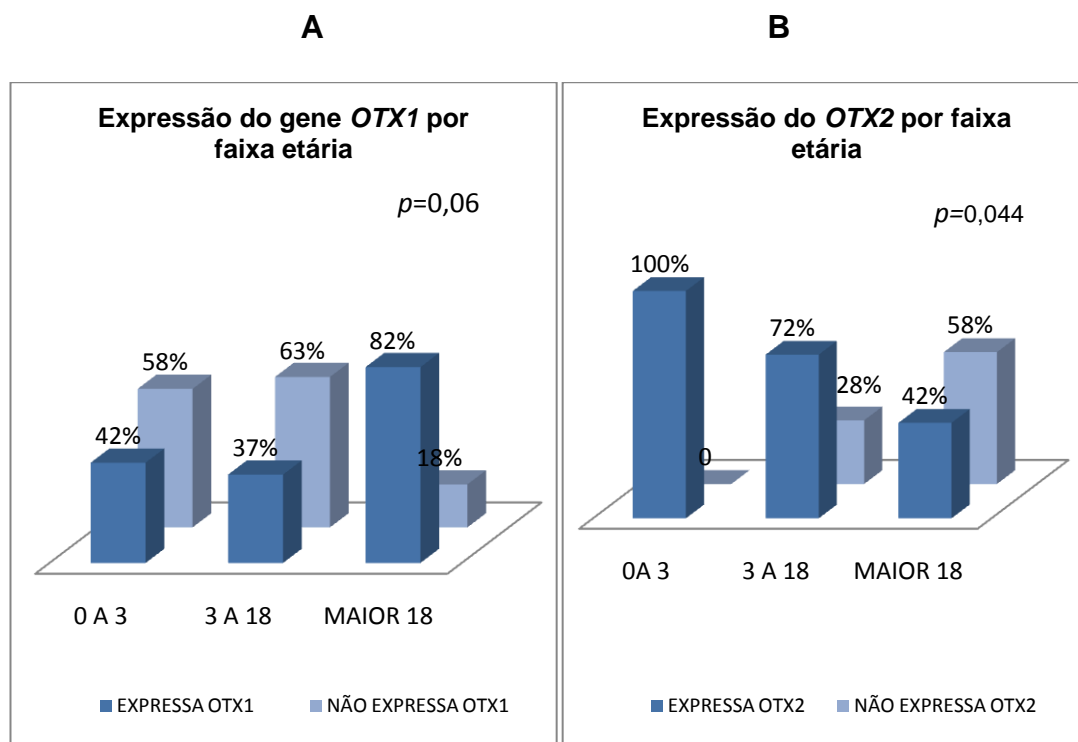
##### 4.4.1. Expressão gênica e faixa etária

Com tais dados de expressão gênica, foram elaboradas planilhas comparando a expressão dos genes, nas diferentes faixas etárias.

**Tabela 8:** Perfil fenótipo-nível de expressão gênica nas diferentes faixas etárias

FAIXA ETÁRIA	0A 3 ANOS	3ANOS1M-18 ANOS	MAIOR 18 ANOS
Numero de pacientes	7	31	22
Sexo	3 M 4 F	17 M 14F	17M 5 F
Tipo histológico	clássico 57% desmoplásico 14% células gigantes 29%	clássico 65% desmoplásico 12% células gigantes 9% extensa nodularidade 9% anaplásico 5%	clássico 68% desmoplásico27% células gigantes5%
Topografia	100%vermis(7)	vermis 83%(26) hemisfério 17%(5)	vermis 59%(12) hemisfério41%(10)
<b>Perfil genético</b>			
<i>Otx1+otx2-</i>	0	5	14
<i>Otx1-otx2+</i>	4	15	4
<i>Otx1+otx2+</i>	3	6	6
<i>Otx1-otx2-</i>	0	3	0
Disseminação inicial	57%	27%	4%
Curso com metástase	57%	40%	16%
Sobrevida em 5 anos	66%	65%	60%
Particularidade			disseminação extraneural

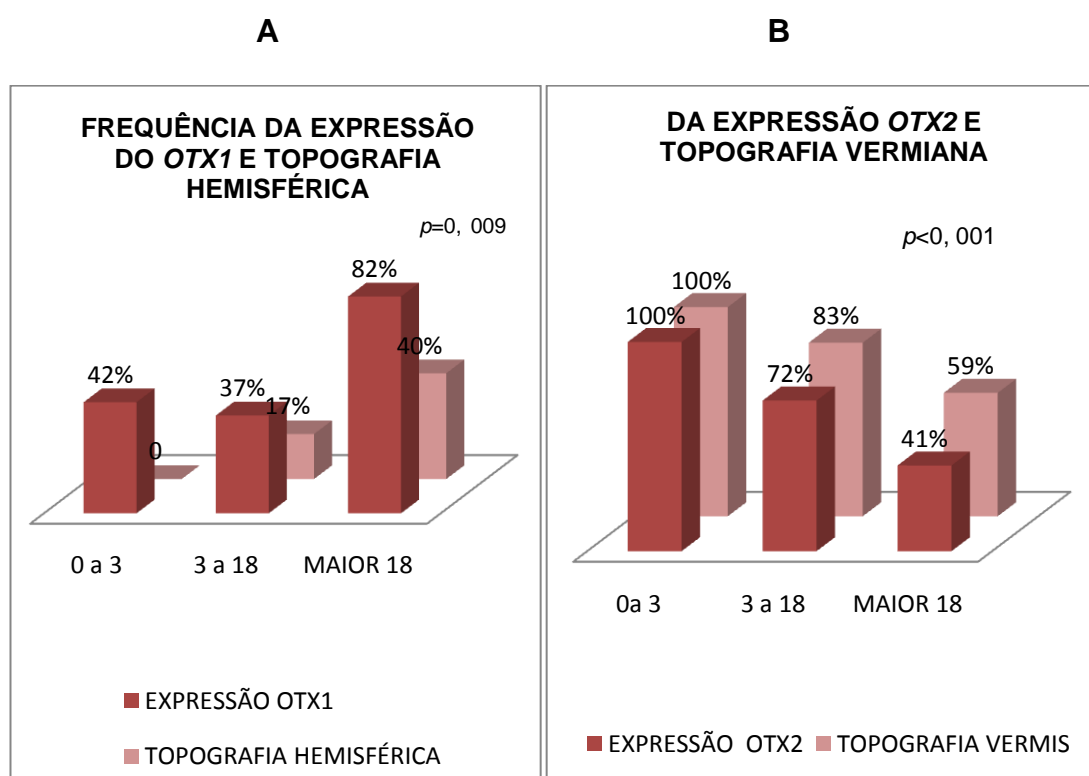
O gráfico 16A abaixo mostra a freqüência da expressão do gene *OTX1* pela faixa etária. A expressão do gene na faixa etária de 0 a 3 anos foi de 42%, freqüência que diminuiu discretamente na faixa etária de 3 a 18anos, e que voltou a subir de forma significativa na faixa etária maior de 18 anos (82% dos pacientes expressam o gene). Não houve relação estatisticamente significativa entre idade e expressão do gene *OTX1* ( $p=0,06$ ). O gráfico 16B mostra a freqüência da expressão do gene *OTX2* pela faixa etária. A expressão do gene na faixa etária de 0 a 3 anos é da ordem de 100%, freqüência que diminui gradualmente de acordo com o aumento dos grupos etários. Houve relação estatisticamente significativa entre idade e expressão do gene *OTX2* ( $p=0,044$ ).



**Figura 16:** Em A, porcentagem de pacientes que expressam e que não expressam o gene *OTX1*, por faixa etária. Em B, porcentagem de pacientes que expressam e que não expressam o gene *OTX2*, por faixa etária.

O gráfico 17A mostra a frequência da expressão do gene *OTX1* pela faixa etária, combinado com a frequência da localização hemisférica. Há um aumento da frequência de expressão do gene *OTX1* em topografia hemisférica, de acordo com o aumento da idade, com significância estatística ( $p=0,009$ ).

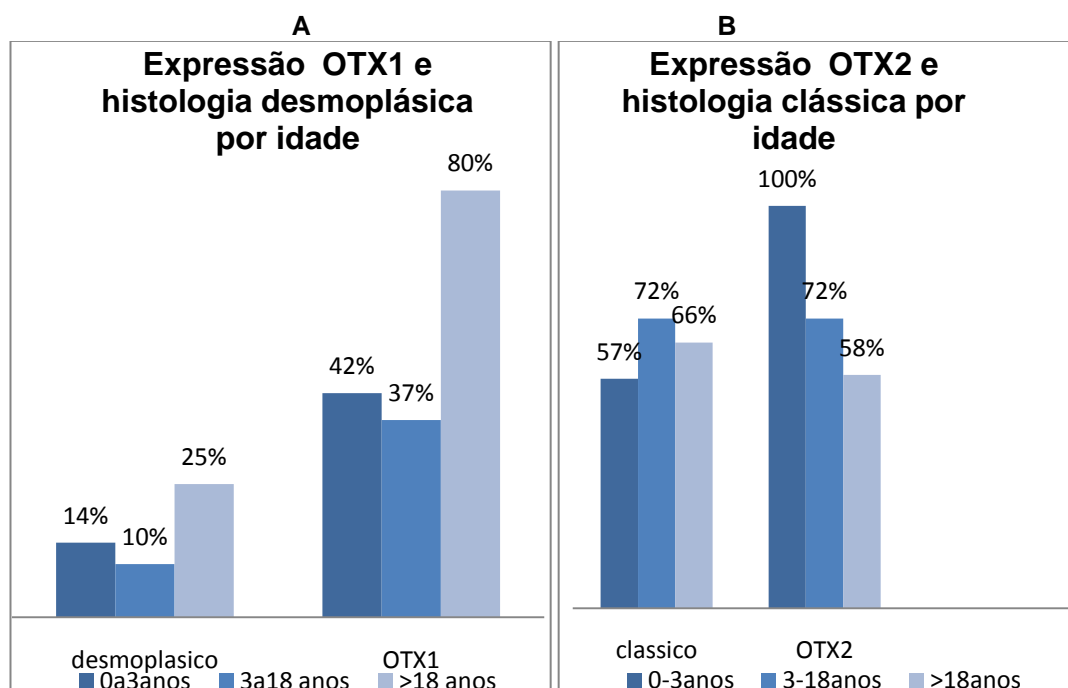
O gráfico 17B mostra a frequência da expressão do gene *OTX2* pela faixa etária, combinado com a frequência da localização vermiana. Há uma diminuição coincidente das frequências de expressão do gene *OTX2* e da topografia vermiana, de acordo com o aumento da idade dos pacientes, com significância estatística ( $p<0,001$ ).



**Figura 17:** Em A, porcentagem de pacientes que expressam o gene *OTX1* e com tumores de topografia hemisférica, nas diferentes faixas etárias. Em B, porcentagem de pacientes que expressam o gene *OTX2* e com tumores de topografia vermiana, nas diferentes faixas etárias.

O gráfico 18A a seguir mostra a frequência do tipo histológico desmoplásico nas diferentes faixas etárias. A frequência do citado tipo histológico é de 14% na primeira infância, sofrendo um leve descenso na faixa etária de 3 a 18 anos (10%); e voltando a subir na idade adulta, onde representa 25% dos meduloblastomas. A frequência da expressão do gene *OTX1* comporta-se de forma similar ao tipo desmoplásico, nas faixas etárias citadas.

O gráfico 18B mostra a frequência do tipo histológico clássico nas diferentes faixas etárias entre os casos com expressão positiva para *OTX2*. A frequência do mesmo é de 57% na primeira infância, sofrendo um aumento na faixa etária de 3 a 18 anos (72%); e uma queda de frequência na idade adulta, onde representa 66% dos meduloblastomas.



**Figura 18:** em A, frequência do tipo desmoplásico nas diferentes faixas etárias e a concomitante expressão do gene *OTX1*. Em B, frequência do tipo clássico nas diferentes faixas etárias e a concomitante expressão do gene *OTX2*.

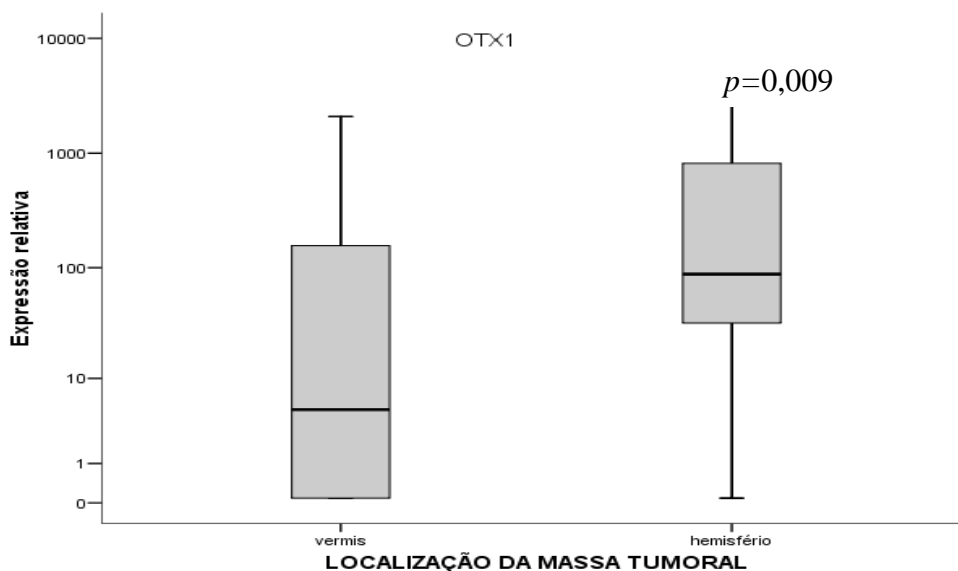
#### 4.4.2. Expressão gênica e topografia tumoral

Para testar a hipótese de diferenças entre o nível de expressão gênica e os tumores de topografia vermiana e hemisférica, os dados foram organizados e podem ser verificados na tabela abaixo e a seguir nos gráficos 19 e 20.

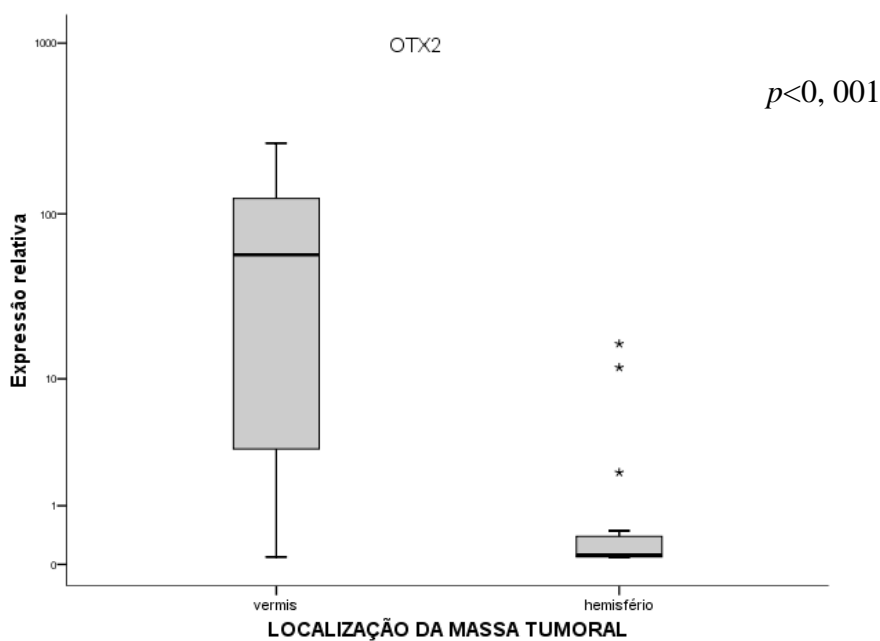
**Tabela 9:** Perfil fenótipo- nível de expressão gênica por divisão topográfica

Características	VERMIS	HEMISFERIO
<b>Numero de pacientes</b>	45	15
<b>Média de idade</b>	13anos7m	23anos4meses
<b>Sexo</b>	54% homens 46% mulheres	72% homens 28%mulheres
<b>Tipo histológico</b>	clássico 74% desmoplásico 6% células gigantes 10% extensa nodularidade 7% anaplásico 3%	clássico 40% desmoplásico 54% células gigantes 6% extensa nodularidade 0 anaplásico 0
<b>Perfil genético</b>		
<b>Otx1+otx2-</b>	7	12
<b>Otx1-otx2+</b>	23	0
<b>Otx1+otx2+</b>	13	2
<b>Otx1-otx2-</b>	2	1
<b>Disseminação inicial</b>	15%	14%
<b>Curso com metástase</b>	20%	40%
<b>Sobrevida em 5 anos</b>	53%	53%
<b>Particularidade</b>		disseminação extraneural

Abaixo, seguem as representações gráficas do teste de Mann-Whitney, que mostrou relação estatisticamente significativa entre a expressão do gene *OTX1* com a topografia hemisférica ( $p=0,009$ ); e do gene *OTX2* com a topografia vermiana ( $p<0,001$ ).



**Figura 19:** Relação da expressão do gene *OTX1* com topografia tumoral



**Figura 20:** Relação da expressão do gene *OTX2* com topografia tumoral

#### 4.4.3. Expressão gênica e tipo histológico

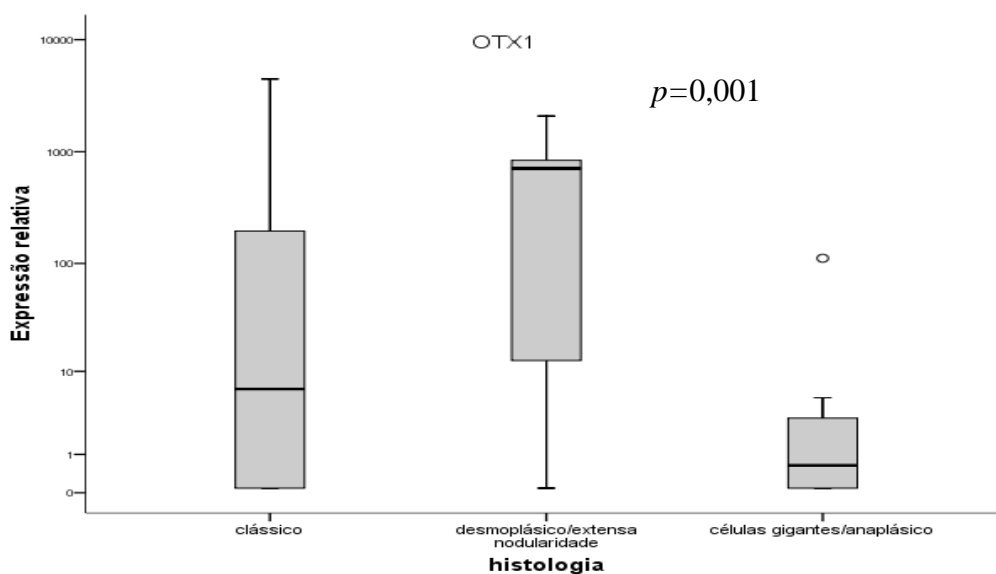
Para testar a hipótese de diferenças no nível de expressão gênica entre os tumores de diferentes tipos histológicos, os dados foram organizados e podem ser verificados na tabela abaixo e podem ser visualizados nos gráficos 21 e 22.

**Tabela 10:** Perfil fenótipo- nível de expressão gênica nos diferentes subtipos histológicos

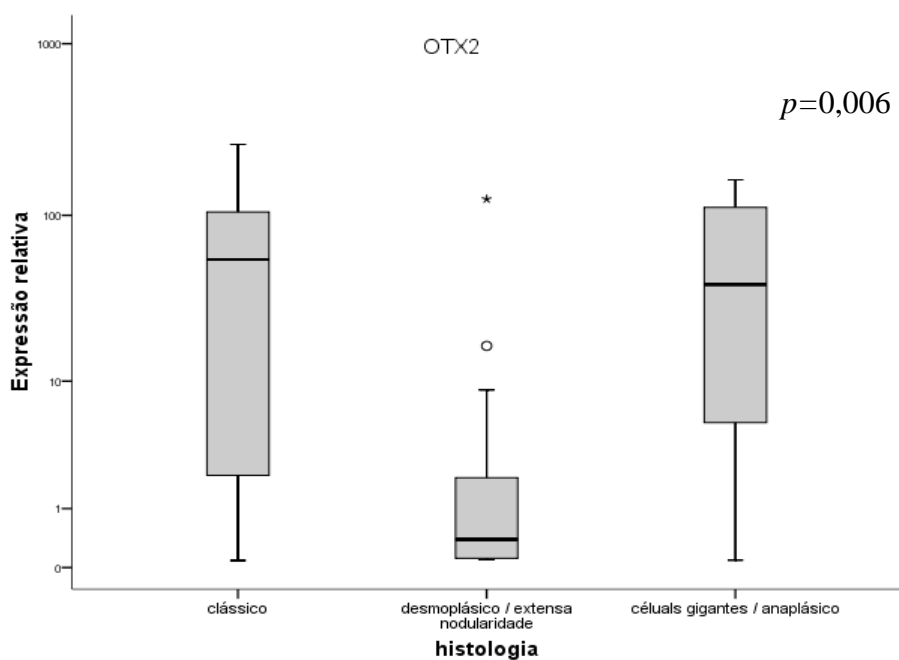
	CLÁSSICO	DESMOPLÁSICO	CÉLULAS GIGANTES	EXTENSA NODULARIDADE	ANAPLASICO
<b>Numero de pacientes</b>	39	11	6	3	1
<b>Média de idade</b>	16a3m	20a8m	10a8m	4a6m	17a10m
<b>Sexo</b>	58% homens 42% mulheres	72% homens 28% mulheres	66% homens 34% mulheres	66%homens 34%mulheres	100% mulheres
<b>Perfil genético</b>					
<b>Otx1+otx2-</b>	9	8	1	1	-
<b>Otx1-otx2+</b>	19	0	4	0	-
<b>Otx1+otx2+</b>	11	3	0	1	-
<b>Otx1-otx2-</b>	0	0	1	1	1
<b>Disseminação inicial</b>	12%	28%	16%	0	N
<b>Curso com metástase</b>	24%	28%	100%	0	S
<b>Sobrevida em 5 anos</b>	56%	81%	20%	100%	96m
<b>Particularidade</b>			-todos cursaram com metástase		



Abaixo, seguem as representações gráficas do teste de Kruskal Wallis, que mostrou relação estatisticamente significativa entre a expressão do gene *OTX1* com o tipo histológico desmoplásico/extensa nodularidade ( $p=0,001$ ); e do gene *OTX2* com o tipo clássico ( $p=0,006$ ).



**Figura 21:** Relação da expressão do gene *OTX1* com os tipos histológicos



**Figura 22:** Relação da expressão do gene *OTX2* com os tipos histológicos

#### 4.5. Perfil dos grupos de expressão gênica *OTX1* e *OTX2*

Os pacientes de diferentes níveis de expressão gênica foram também comparados em relação ao seu perfil clínico, como pode ser observado na tabela abaixo:

**Tabela 11:** Perfil de expressão gênica *OTX1* e *OTX2* e fenótipo

Perfil genético	<i>OTX1+OTX2-</i>	<i>OTX1-OTX2+</i>	<i>OTX1+OTX2+</i>	<i>OTX1-OTX2-</i>
<b>Numero de pacientes</b>	19 (32%)	24 (40%)	13(22%)	4(6%)
<b>Média de idade</b>	26 anos 1m	10 anos 2m	13 anos 8 meses	12 anos
<b>Sexo</b>	79%homens 21%mulheres	38%homens 62%mulheres	77%homens 23%mulheres	75%homens 25%mulheres
<b>Topografia</b>	42%vermis 58%hemisfério	100% em vermis	85% vermis 15% hemisfério	50%vermis 50%hemisfério
<b>Tipo histológico</b>	53%clássico 37%desmoplásico 5% células gigantes 5% extensa nodularidade	79% clássico 4% desmoplásico 17% células gigantes	77%clássico 15% desmoplásico 8%extensa nodularidade	33%células gigantes 33%extensa Nodularidade 33% anaplásico
<b>Disseminação inicial</b>	12%	20%	14%	0
<b>Curso com metástase</b>	40%	40%	14%	100%
<b>Sobrevida em 5 anos</b>	84%	40%	57%	66%
<b>Particularidade</b>	-predileção hemisfério	-predomínio sexo feminino -histologia clássica	-disseminação extraneural	-somente em crianças

#### 4.5.1. Perfil de pacientes *OTX1*<sup>+</sup>

A tabela abaixo descreve de forma pormenorizada os pacientes que expressam o gene *OTX1*, em relação a seus últimos exames, topografia tumoral, histologia e disseminação líquórica. Houve relação estatisticamente significativa entre a expressão do gene *OTX1* e pacientes livres de doença em controle de imagem ( $p=0,033$ ). Houve também relação da expressão do gene *OTX1* com topografia hemisférica ( $p=0,009$ ) e tipo histológico anaplásico ( $p=0,001$ ). Não houve relação entre a expressão do gene *OTX1* e disseminação líquórica inicial da doença ( $p=0,718$ ).

**Tabela 12:** Distribuição dos indivíduos segundo a expressão do gene *OTX1*, resultado dos últimos exames, local da massa tumoral, disseminação inicial (imagem/líquor) e tipo histológico do tumor.

	Expressão do gene <i>OTX1</i>		Total (n=60)	P
	não (n=26)	sim (n=34)		
<b>Controle da doença</b>				
Óbito sem disseminação	1 (3,7%)	-	1 (1,7%)	0,033
Óbito no POI	-	1 (3%)	1 (1,7%)	
Recidiva	8(30%)	7 (21%)	15 (25%)	
Resíduos tumorais	4 (15%)	-	4 (6%)	
Livre de doença	14 (51%)	25 (75%)	39 (65%)	
<b>Hemisfério</b>	1 (3%)	14 (42%)	15 (25%)	0,009
Vermis	26 (96%)	19 (57%)	45 (75%)	
<b>Disseminação inicial (imagem/líquor)</b>				
Sim	5 (19%)	4 (13%)	9 (15%)	0,718
Não	21 (81%)	30 (87%)	51 (85%)	
<b>Tipo histológico do tumor</b>				
Anaplásico	1 (3%)	-	1(1%)	0,001
Células gigantes	5 (18%)	1 (3%)	6 (10%)	
Clássico	19 (48%)	19 (51%)	39 (65%)	
Desmoplásico	-	11(33%)	11(18%)	
Extensa nodularidade	1 (3%)	2 (6%)	3 (5%)	

#### 4.5.2. Perfil de pacientes *OTX2*<sup>+</sup>

A tabela abaixo descreve de maneira mais minuciosa os pacientes que expressam o gene *OTX2*, em relação a seus últimos exames, topografia tumoral, histologia e disseminação liquórica. Verifica-se a relação da expressão do gene *OTX2* com a topografia vermiana ( $p < 0,001$ ), e tipo histológico clássico ( $p = 0,006$ ). Não se observou relação com controle da doença (sem tumor) ( $p = 0,964$ ) ou disseminação liquórica inicial.

**Tabela 13:** Distribuição dos indivíduos segundo a expressão do gene *OTX2*, resultado dos últimos exames, local da massa tumoral, disseminação inicial (imagem/líquor) e tipo histológico do tumor.

	Expressão do gene <i>OTX2</i>			P
	não (n=22)	sim (n=38)	Total (n=60)	
<b>Controle da doença</b>				
Óbito sem disseminação	-	1(3%)	1(2%)	0,964
Óbito no POI	-	1(2%)	1(1%)	
Recidiva	5(22%)	10(26%)	15(25,0%)	
Resíduos tumorais	2(9%)	2(5%)	4(6%)	
Sem tumor	15(68%)	24(63%)	39(65%)	
<b>Topografia da massa tumoral</b>				
Hemisfério	13(59%)	2(5%)	15(25%)	<0,001
Vermis	9(40%)	36(94%)	45(75%)	
<b>Disseminação inicial (imagem/líquor)</b>				
Sim	2(9%)	7(18%)	9(15%)	0,464
Não	20(90%)	31(81%)	51(85%)	
<b>Tipo histológico do tumor</b>				
Anaplásico	1(4%)	-	1(1%)	0,006
Células gigantes	2(10%)	4(10%)	6(10%)	
Clássico	9(41%)	30(80%)	39(65%)	
Desmoplásico	8(36%)	3(8%)	11(19%)	
Extensa nodularidade	2(9%)	1(2%)	3(5%)	

#### **4.5.3. Perfil comparativo de pacientes dos diferentes grupos de expressão gênica**

A tabela a seguir mostra a comparação entre as características dos pacientes dos diferentes grupos de expressão gênica (*OTX1+OTX2-*; *OTX1-OTX2+*; *OTX1+OTX2+*; *OTX1-OTX2-*).

Verificou-se relação entre topografia e tipo histológicos para os pacientes que expressaram os genes *OTX1* e *OTX2* (já descrito). Não houve, porém, relação da expressão de ambos os genes com controle da doença (sem tumor) ( $p=0,052$ ) ou disseminação líquórica inicial ( $p=0,840$ ).

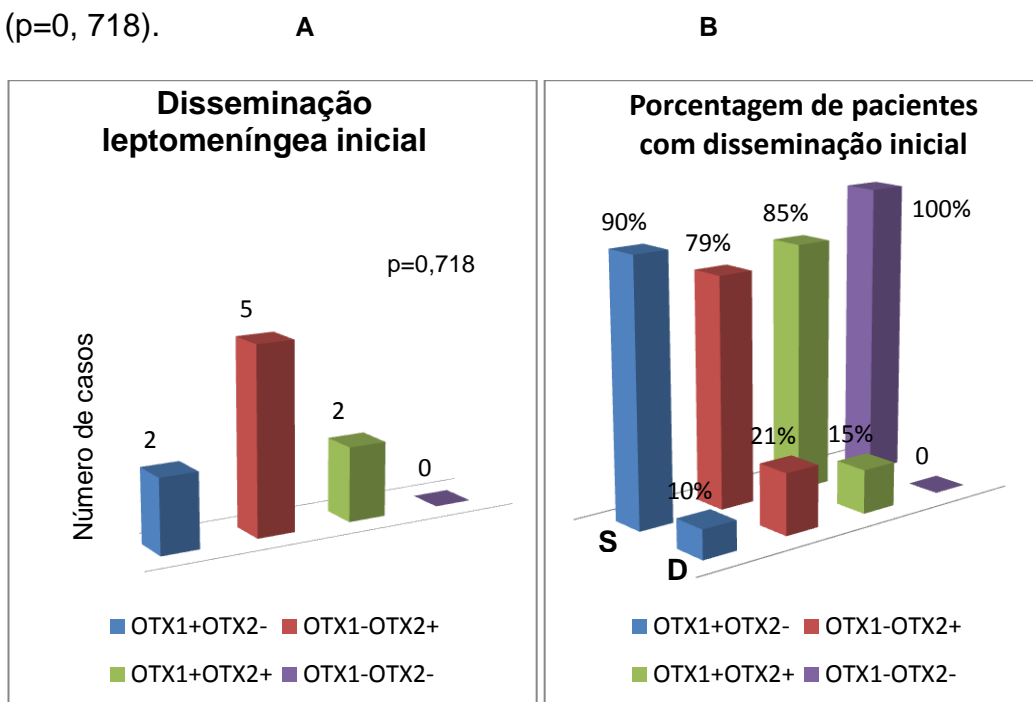
**Tabela 14:** Distribuição dos indivíduos segundo a expressão dos genes *OTX1* e *OTX2*, resultado dos últimos exames, local da massa tumoral, disseminação inicial (imagem/líquor) e tipo histológico do tumor.

Controle da doença	Expressão dos genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i>				total (n=60)	P
	ambos (n=15)	somente <i>OTX1</i> (n=19)	somente <i>OTX2</i> (n=23)	nenhum (n=3)		
Óbito sem disseminação	-	-	1	-	1	0,052
Óbito no POI	-	-	4%	-	1%	
Ressecção parcial/recidiva	1	-	-	-	1	15
Resíduos tumorais	2	3	10	1	25%	
Sem tumor	13%	20%	66%	1%	6%	39
	786%	73%	54%	33%	65%	
<b>Topografia</b>	<b>ambos (n=14)</b>	<b>somente <i>OTX1</i> (n=19)</b>	<b>somente <i>OTX2</i> (n=24)</b>	<b>nenhum (n=3)</b>	<b>total (n=60)</b>	<b>P</b>
Hemisfério	2	12	-	1	15	<0,001
Vermis	14%	63%	-	33%	25,0	
	13	7	23	2	45	
	85%	36%	100%	66%	75%	
<b>Disseminação inicial</b>	<b>ambos (n=14)</b>	<b>somente <i>OTX1</i> (n=19)</b>	<b>somente <i>OTX2</i> (n=24)</b>	<b>nenhum (n=3)</b>	<b>total (n=60)</b>	<b>P</b>
Sim	2	2	5	0	9	0,840
Não	14	10	20	0	15	
	13	17	18	3	51	
	85	89	79	100	85	
<b>Histologia</b>	<b>ambos (n=14)</b>	<b>somente <i>OTX1</i> (n=19)</b>	<b>S omente <i>OTX2</i> (n=24)</b>	<b>nenhum (n=3)</b>	<b>total (n=60)</b>	<b>P</b>
Anaplásico	-	-	-	1	1	<0,001
Células gigantes	-	-	-	33%	1%	
Clássico	-	1	4	1	6	39
Desmoplásico	11	9	19	-	65%	
Extensa nodularidade	71%	47%	83%	-	18%	11
	3	8	-	-	11	3
	21%	42%	-	-	18%	5%
	1	1	-	1	3	
	7%	5%	-	33%	5%	

## 4.6. Desenvolvimento de metástases

### 4.6.1. Disseminação inicial

Nove pacientes apresentaram metástases ao momento do diagnóstico. Cinco eram do grupo *OTX1-OTX2+*, 2 do grupo *OTX1+OTX2+*, e 2 do grupo *OTX1+OTX2-*. O gráfico **A** mostra o perfil genético dos casos que apresentaram metástases leptomeníngeas ao momento do diagnóstico inicial. Em **B** estão representadas as porcentagens de disseminação inicial para cada grupo genotípico. Entre os diferentes grupos, aqueles com expressão do gene *OTX2* apresentaram uma maior frequência de disseminação. Este dado, porém, não apresentou significância estatística ( $p=0,718$ ).

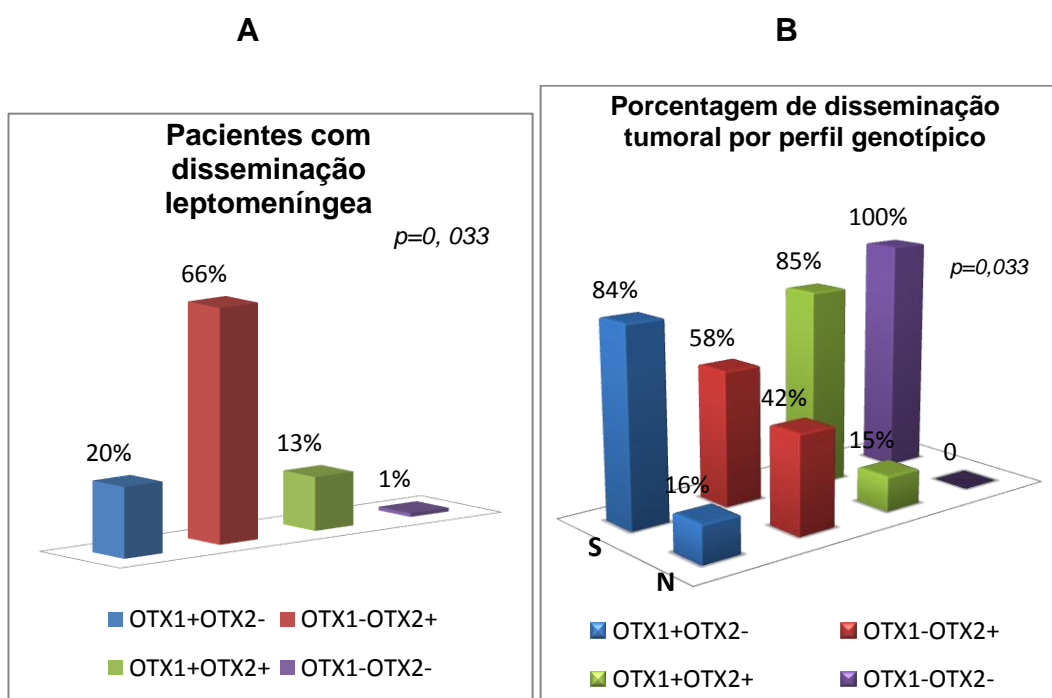


S: sem disseminação inicial; D: com disseminação inicial

**Figura 23:** Distribuição dos pacientes que apresentaram disseminação leptomeníngea (A) e grupo que apresenta e não apresenta disseminação inicial, para cada perfil de expressão gênica(B)

#### 4.6.2. Disseminação ao longo da evolução

Quinze pacientes (25%) apresentaram disseminação leptomeníngea da doença ao longo de sua evolução. O gráfico descreve os 4 grupos de perfis de expressão gênica *OTX1* e *OTX2* destes pacientes. Entre eles, o predomínio foi do grupo *OTX1-OTX2+*, seguido dos grupos *OTX1+OTX2-*, *OTX1+OTX2+*. Nenhum paciente com genótipo *OTX1-OTX2-* apresentou disseminação leptomeníngea da doença. A presença da expressão do gene *OTX2* foi associada, de forma estatisticamente significativa, a risco para disseminação leptomeníngea da doença ( $p=0,033$ ).



S=sem disseminação;D= disseminação

**Figura 24:** Em A, perfil dos pacientes que apresentaram disseminação leptomeníngea, em porcentagem. Em B, porcentagem dos pacientes que apresentaram e não apresentaram disseminação ao longo da evolução da doença, para cada perfil de expressão gênica *OTX1* e *OTX2*.



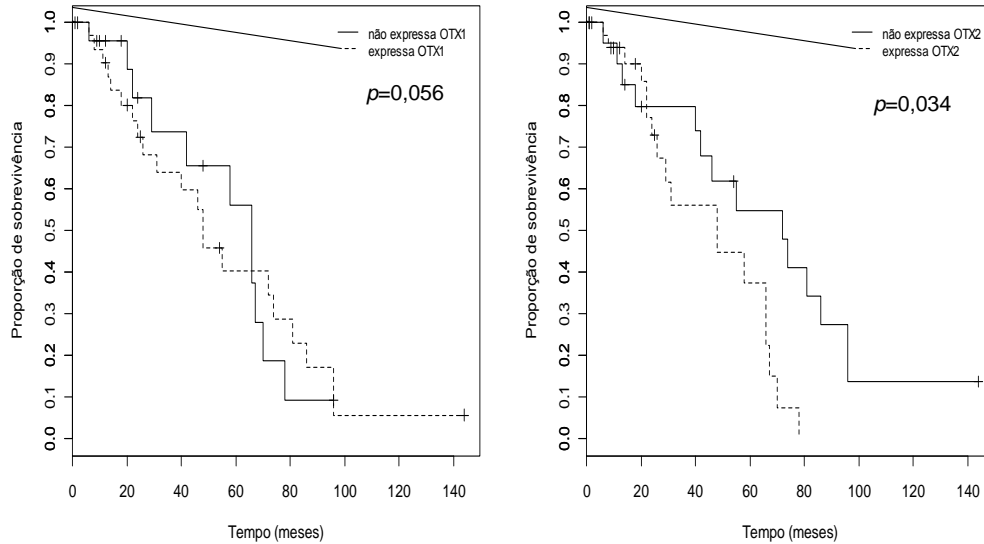
#### 4.7. Curvas de sobrevida para os diferentes grupos de expressão gênica *OTX1* e *OTX2*

Após a verificação da relação da expressão gênica com aspectos fenotípicos, foram então elaboradas tabelas para o cálculo da sobrevida entre os grupos. As medidas de sobrevida podem ser verificadas abaixo:

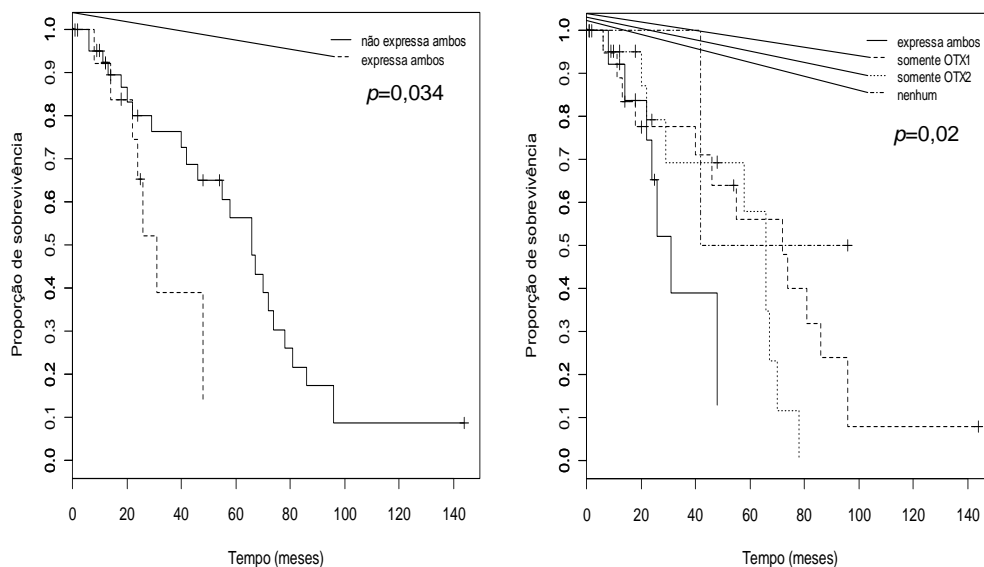
**Tabela 15:** Medidas-resumo do tempo de sobrevida segundo expressão do gene *OTX1* e *OTX2*.

Expressão do gene <i>OTX1</i>	status	N	média	median a	mínimo	máximo	desvio- padrão
não	óbito	16	17,8	9,5	1,0	96,0	24,1
	vivo	11	47,6	58,0	6,0	78,0	24,7
	Total	27	30,0	20,0	1,0	96,0	28,2
sim	óbito	11	36,8	24,0	6,0	144,0	38,7
	vivo	21	43,6	40,0	6,0	96,0	30,1
	Total	32	41,3	28,5	6,0	144,0	32,8
Expressão do gene <i>OTX2</i>	status	N	média	mediana	mínimo	máximo	desvio-padrão
não	óbito	8	46,9	30,0	1,0	144,0	50,0
	vivo	14	52,6	50,5	6,0	96,0	32,2
	Total	22	50,5	44,0	1,0	144,0	38,5
sim	óbito	19	16,6	12,0	1,0	48,0	13,6
	vivo	18	39,1	30,0	6,0	78,0	23,5
	Total	37	27,5	22,0	1,0	78,0	22,0
Expressão dos genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i>	status	N	média	mediana	mínimo	máximo	desvio-padrão
ambos os genes <i>OTX1</i> e <i>OTX2</i>	óbito	5	25,4	24,0	12,0	48,0	13,7
	vivo	8	27,6	25,0	8,0	48,0	14,4
	Total	13	26,8	24,0	8,0	48,0	13,6
somente o <i>OTX1</i>	óbito	6	46,3	30,0	6,0	144,0	51,0
	vivo	13	53,4	55,0	6,0	96,0	33,4
	Total	19	51,2	46,0	6,0	144,0	38,4
somente o <i>OTX2</i>	óbito	14	13,4	9,5	1,0	48,0	12,6
	vivo	10	48,2	62,0	6,0	78,0	26,0
	Total	23	27,9	19,0	1,0	78,0	25,7
nenhum gene	óbito	2	48,5	48,5	1,0	96,0	67,2
	vivo	1	42,0	42,0	42,0	42,0	.
	Total	4	46,3	42,0	1,0	96,0	47,6

A representação gráfica da tabela através de curvas de Kaplan Meier pode ser vista a seguir:



**Figura 25:** Curvas de Kaplan Meier: em A comparação da sobrevida de pacientes  $OTX1+$  versus  $OTX1-$ . Em B, comparação da sobrevida de pacientes  $OTX2+$  versus  $OTX2-$ .



**Figura 26:** Curvas de Kaplan Meier: em A comparação da sobrevida de pacientes  $OTX1+OTX2+$  versus  $OTX1-OTX2-$ . Em B, comparação da sobrevida de pacientes  $OTX1+OTX2+$ ,  $OTX1-OTX2-$ ,  $OTX1+OTX2-$  e  $OTX1-OTX2+$ .

Embora se verifique uma tendência de melhor evolução clínica para os pacientes que expressam o gene *OTX1*, não foi observada diferença de sobrevida entre os pacientes que expressam este gene e os que não o expressam ( $p=0,056$ ).

Em relação ao gene *OTX2*, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os pacientes que expressam e os que não expressam o gene, sendo menor nos pacientes que expressam o gene *OTX2* ( $p=0,034$ ). Foram também analisadas curvas de sobrevida comparando os grupos que não expressam *OTX1* e *OTX2*, com o grupo que expressa os dois genes. Neste grupo, a sobrevida foi significativamente menor ( $p=0,034$ ).

Quando foram analisadas as curvas de sobrevidas para os diferentes de grupos de expressão gênica, observa-se que o grupo com a menor sobrevida é o grupo que expressa apenas o gene *OTX2* ( $p=0,02$ ).

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1. Aspectos clínico-patológicos**

O meduloblastoma é caracteristicamente um tumor infantil, que acomete principalmente crianças do sexo masculino ao redor dos sete anos de idade. O tumor, porém, pode ocorrer também em adultos. Autores como Giordana et al.(1997), descrevem que até 15% a 30% dos meduloblastomas diagnosticados correspondem a indivíduos adultos. Na presente casuística de 60 pacientes, observamos um predomínio do grupo infantil, perfazendo 63,4% da amostra. Os adultos representaram 36,7%, um número discretamente maior que o descrito pela literatura, mas que pode ser apenas um viés de amostragem. Em concordância com vários autores (Giordana et al., 1997; Akay et al., 2004; Rutkowski et al., 2010) houve predomínio do sexo masculino.

Estudos prévios descrevem um pior prognóstico entre as crianças menores que três anos (Giordana et al.,1997;Allen et al.,2009). Outros autores, por sua vez, afirmam que esta diferença não é constante (Duffner et al.; Akay et al., 2004). Nesta casuística, não foi observada diferença estatisticamente significativa, talvez pelo número relativamente pequeno de pacientes para este tipo de estimativa. Verificou-se, porém, uma tendência a maior agressividade da doença, com maior índice de disseminação leptomeningea, tanto à apresentação da doença, como durante o curso da mesma, na faixa pediátrica (de 0 a 3 anos e de 3 a 18 anos).

Em relação à localização, observou-se que 45 pacientes possuíam tumores vermianos e 15 tumores hemisféricos. Não há consenso na respeito da proporção exata entre meduloblastomas vermianos e hemisféricos, mas a ocorrência destes últimos está fortemente ligada à idade adulta (Ferrante et al., 1991; Koci et al., 1993; Malheiros et al., 2003). Tal inferência está de acordo com o observado na presente casuística, onde 67% dos pacientes com tumores hemisféricos eram adultos. Não são estabelecidas também diferenças de sobrevida entre as duas topografias.

Testou-se, porém a hipótese que o prognóstico dos meduloblastomas hemisféricos possa ser melhor que os vermianos, com a elaboração de uma curva de Kaplan Meier para comparação de sobrevida entre pacientes com tumores hemisféricos e vermianos. Embora tenha sido observada uma tendência a maior sobrevida dos pacientes com meduloblastomas hemisféricos, esta não foi estatisticamente significativa ( $p=0,378$ ).

De forma concordante com trabalhos prévios (Eberhart et al., 2002; Gilbertson et al., 2008), a variante histológica mais freqüente foi o clássico, em 65% dos casos, seguida pelo desmoplásico (18,3%), células gigantes (10%), extensa nodularidade (5%) e anaplásico (1,7%). A maior média de idade ocorreu entre indivíduos com subtipo desmoplásico, e a menor entre pacientes com subtipo extensa nodularidade.

É marcante a observação dos perfis de meduloblastoma ao longo das faixas etárias: durante a infância há predomínio de tumores vermianos com histologia clássica. Com a progressão da idade, este perfil vai sendo substituído por meduloblastomas hemisféricos do tipo. A curva de sobrevida

não mostrou diferenças entre os grupos histológicos. Nota-se, porém, que a seqüência das três curvas aponta para uma tendência de melhor sobrevida em adultos, com tumores hemisféricos e desmoplásicos ( $p=0,285$ ). É provável que em uma amostra maior, tal tendência se mostrasse significativa estatisticamente.

O meduloblastoma é um tumor com grande potencial de disseminação leptomeníngea (Bailey e Cushing, 1925; Engelhard et al.,2005). Este dado pôde ser verificado nesta casuística, onde 15 pacientes (25 % dos pacientes) apresentaram disseminação leptomeníngea ao longo de sua evolução. Tal potencial de disseminação foi verificado também em 01 paciente que apresentou metástases sistêmicas de meduloblastoma. Os estudos prévios descrevem um percentual 1 a 5 % de disseminação extraneural em meduloblastomas, na maioria dos casos relacionados à derivação ventrículo-peritoneal (Eberhart et al. 2003). No paciente da presente casuística, não havia implante de derivação ventrículo-peritoneal, o que sugere disseminação hematogênica da doença.

## 5.2.A expressão do gene *OTX1*

Desde a descrição por Simeone et al., 1992, o gene *OTX1* permanece pouco compreendido. Autores como Acampora et al. (2003), descrevem seu papel como regulador da expressão do gene *OTX2*. Outros, como Ando et al. (2008), defendem sua atividade independente e dominante para a formação de regiões anteriores do encéfalo embrionário. Poucos trabalhos, como o de Haas et al. (2006), descrevem a sua expressão em alguns subtipos de meduloblastomas, como o hemisférico e o subtipo desmoplásico. Estas observações porém, são bastante restritas, pois não se conhece a frequência da expressão, seus mecanismos tumorigênicos e seu valor prognóstico. No gráfico de dispersão (Figura 14) apresentado nesta tese, não se verificou diferença estatisticamente significativa entre a expressão gênica do gene *OTX1* na população estudada e as amostras de cerebelo não neoplásico. Este dado refere-se porém, à população total. Analisando-se individualmente cada amostra, verifica-se que 52% dos meduloblastomas apresentaram expressão gênica maior que os tecidos cerebelares, ou seja, foram positivos para expressão gênica. Como não se observa a expressão do gene *OTX1* no tecido cerebelar humano após a nona semana de vida extra uterina, esta porcentagem de expressão é significativa.

### 5.3.A expressão do gene *OTX2*

Embora mais conhecido e estudado que o gene *OTX1*, o conhecimento sobre o gene *OTX2* ainda não está consolidado. Não se estabeleceu até o momento a sua frequência e significado prognóstico em meduloblastoma.

No gráfico de dispersão (Figura 15) apresentado neste trabalho, não se verificou diferença estatisticamente significativa entre a expressão gênica do gene *OTX2* na população estudada e as amostras de cerebelo não neoplásico. Este dado refere-se, assim como no gene *OTX1*, à população total. Analisando-se individualmente cada amostra, verifica-se que 62% dos meduloblastomas apresentaram expressão gênica maior que os tecidos cerebelares, ou seja, foram positivos para expressão gênica. Similarmente, ao gene *OTX1*, não se observa a expressão do gene *OTX2* no tecido cerebelar humano após a nona semana de vida extra uterina. Esta porcentagem de expressão é portanto, bastante significativa. Estes dados reforçam que em ao menos 62% destes tumores a via tumorigênica dos genes *OTX* é importante. As outras vias tumorigênicas envolvidas no meduloblastoma, como a da  $\beta$  catenina, a Hedgehog e a NOTCH podem ainda estar presentes na população que não expressou estes genes (38%), ou ainda coexistir nestes pacientes que expressaram os genes *OTX*.



## **5.4. Correlações dos níveis de expressão gênica e o fenótipo**

### **5.4.1. Expressão gênica e idade**

A expressão gênica mostrou íntima relação com a idade, sendo estatisticamente significativa para o gene *OTX2* em crianças, especialmente com menos de 3 anos. O gene *OTX2* é um gene *homeobox*, ou seja, é um gene comprometido com a embriogênese. Desta forma, mesmo em sua expressão anômala, como ocorre no meduloblastoma, espera-se que sua expressão esteja presente principalmente em crianças. O resultado demonstrado nesta tese é portanto, coerente com as características do gene *OTX2*. Este dado é inédito e são necessários outros estudos para o estabelecimento desta relação, uma vez que o presente dado não é concordante com os estudos prévios descritos na literatura como o de Haas et al. (2007),. Este autores observaram ausência de expressão de *OTX2* entre crianças menores de 3 anos. Este resultado, porém, pode ser devido a vícios de amostragem ou ao tamanho reduzido da população estudada.

A expressão do gene *OTX1* também se mostrou relacionada à idade, porém sem significância estatística. Foi observada uma forte tendência desta expressão gênica na idade adulta. Este dado reserva uma interpretação mais difícil que a do gene *OTX2*, já que o gene *OTX1* também é um gene *homeobox*, e como tal, espera-se que seja expresso em maior frequência em pacientes mais jovens. Desconhece-se, porém, os mecanismos de ativação deste gene, suas relações hierárquicas com o gene *OTX2* e seu potencial tumorigênico. Além disto, a existência de outras vias tumorigênicas

pode influenciar, de forma ainda não conhecida, a expressão alternada, sequencial ou concomitante dos genes *OTX1* e *OTX2*.

#### **5.4.2. Expressão gênica e topografia tumoral**

Na presente tese, observamos relação estatisticamente significativa entre a expressão do gene *OTX1* e topografia hemisférica; e do gene *OTX2* com a topografia vermiana. Esta relação já havia sido observada por Salsano et al. (2004) e de Haas et al. (2006). Tal associação está fundamentada na teoria da heterogeneidade dos meduloblastomas defendida por Gulino et al.(2008), Gilbertson et al(2008) e Behesti et al.(2008). Esta teoria defende que células genotipicamente distintas dão origem a diferentes subtipos de meduloblastomas, conceito válido para as variantes topográficas e histológicas. Desta forma, células da matriz germinativa periventricular ou da camada granulosa mediana de perfil de expressão *OTX2+* podem originar tumores de linha mediana *OTX2+*. Células da camada granulosa lateral *OTX1+OTX2-* dariam origem a tumores hemisféricos *OTX1+OTX2-*. Esta teoria é recente, e com inúmeras lacunas. A relação entre a expressão gênica tumoral e a hipotética célula progenitora nem sempre é correspondente; e as relações com a topografia nem sempre são coincidentes. Na presente casuística, 80% dos tumores vermianos expressam o gene *OTX2*, enquanto 20% não apresentam. Da mesma forma, 13% dos pacientes com tumores hemisféricos apresentam expressão do gene *OTX2*. Provavelmente a topografia tumoral, ou mesmo a expressão do *OTX1* e *OTX2*, são influenciados por outros genes, cujos mecanismos e

envolvimento com os genes *OTX* ainda são pouco conhecidos. Entre estes genes, podemos citar *Neurog1* e *Math1* , descritos por Salsano et al. (2004), e que provavelmente têm importância na determinação topográfica dos meduloblastomas.

Com as devidas restrições à teoria apresentada, os dados desta tese reforçam o conceito de que provavelmente exista uma maior concentração de células progenitoras de meduloblastoma *OTX2+* no vérmis cerebelar, e uma maior concentração de células progenitoras de meduloblastoma *OTX1+* nos hemisférios cerebelares.

### 5.4.3. Expressão gênica e histologia

Na presente casuística, observou-se nítida relação do gene *OTX1* com a variante desmoplásica, com significância estatística. Verificou-se também associação da variante clássica com o gene *OTX2*, também com significância estatística.

As teorias de heterogeneidade dos meduloblastomas, como citado anteriormente, não explicam a relação da expressão gênica com os tipos histológicos de forma tão clara quanto o fazem com a topografia tumoral. Segundo Salsano et al. (2004) e de Haas et al. (2007), há uma forte associação entre as variantes clássicas e o gene *OTX2*, e a variante desmoplásica com o gene *OTX1*. As células progenitoras destas variantes tumorais, além de expressarem os genes acima citados, provavelmente estão submetidas a outros mecanismos tumorigênicos além da via *OTX*. A somatória, portanto da via *OTX* com estes outros mecanismos tumorigênicos, determinariam o tipo histológico deste tumor. Alguns exemplos na presente tese ilustram esta afirmação: 77% dos tumores clássicos expressam o gene *OTX2*, mas 23% não expressam. Dos pacientes com tumores desmoplásicos, 100% dos tumores expressam o gene *OTX1*, porém 27% também expressam o gene *OTX2*.

A literatura também não estabelece claramente a frequência de expressão dos genes *OTX1* e *OTX2* nos tipos histológicos. Boon et al. (2005) descreveram apenas a amplificação do gene *OTX2* em 19% em meduloblastomas. De Haas et al. (2007) descreveram uma frequência de expressão do gene *OTX2* de 85% em meduloblastomas clássicos e 18% em

desmoplásicos. Ainda no mesmo estudo, descrevem uma frequência de expressão do gene *OTX1* de 18% em meduloblastomas clássicos, e de 100% em meduloblastomas desmoplásicos. Os autores não descreveram os perfis de expressão gênica de meduloblastomas de extensa nodularidade, de células gigantes ou anaplásicos.

Nesta casuística, obtivemos uma expressão do gene *OTX1* em 23% dos meduloblastomas clássicos, em 100% dos desmoplásicos, em 16% dos meduloblastomas de células gigantes, 33% nos de extensa nodularidade, e em 0% em anaplásicos. Os dados referentes aos tipos histológicos clássicos e desmoplásicos podem ser considerados semelhantes aos previamente descritos (Ho et al.,2002;Gilbertson et al.,2008). Os dados referentes aos de células gigantes, extensa nodularidade e anaplásicos são inéditos, mas são necessários estudos adicionais para estabelecer um correto perfil de expressão gênica. Em relação ao gene *OTX2*, obtivemos uma expressão do gene em 76% dos meduloblastomas clássicos, em 27% dos desmoplásicos, em 66% dos meduloblastomas de células gigantes, 33% nos de extensa nodularidade, e em 0% em anaplásicos. Os dados referentes aos tipos histológicos clássicos e desmoplásicos assim como para o gene *OTX1*, podem ser considerados semelhantes aos da literatura. Os dados referentes aos de células gigantes e extensa nodularidade também são inéditos, e necessitam ser confirmados em estudos adicionais.

#### **5.4.4. Expressão gênica e metástases**

A literatura não descreve a relação dos genes *OTX1* e *OTX2* com metástases. Observou-se porém, nesta casuística, relação estatisticamente significativa da expressão do gene *OTX2* com o desenvolvimento de metástases ao longo da evolução clínica dos pacientes. Não se observou esta relação para o gene *OTX1*, ou para o desenvolvimento de metástases ao momento do diagnóstico inicial da doença, para ambos os genes. Este achado ainda não foi descrito na literatura, mas sua verificação é coerente com a descrição de autores como Boncinelli et al. (2001), que estabelecem a correlação do gene *OTX2* com a via WNT e moléculas de adesão, como as caderinas e integrinas. As caderinas e integrinas são moléculas envolvidas no desenvolvimento de metástases. Autores como Fiorilli et al. (2008) já descreveram mutações nas integrinas em meduloblastomas, e a ativação de vias de proliferação, adesão e longevidade por estas moléculas. Desta forma, a expressão anômala do gene *OTX2* poderia, hipoteticamente, regular a expressão de caderinas, e desta forma, incrementar o potencial metastático da célula tumoral.

#### **5.4.5. Perfis de expressão gênica *OTX***

Autores como Kool et al. (2008) e Rossi et al. (2008) defendem a estratificação molecular dos meduloblastomas, na tentativa de identificar grupos de maior similaridade molecular e potenciais alvos específicos de terapêutica. Neste estudo, os pacientes foram divididos, com este fim, em

quatro perfis de expressão gênica: os que expressam apenas o gene *OTX1* (*OTX1+* *OTX2-*), os que expressam apenas o gene *OTX2* (*OTX1-**OTX2+*), os pacientes que expressam ambos os genes (*OTX1+* *OTX2+*), e os pacientes que não expressam nenhum dos genes (*OTX1-* *OTX2-*). Observaram-se algumas características nestes grupos, como média de idade mais alta (26 anos) entre pacientes que expressam somente o gene *OTX1*, a localização exclusivamente vermiana em pacientes que expressam apenas o gene *OTX2*. Entre o grupo que expressou ambos os genes, observou-se um paciente com disseminação extraneural da doença; e entre os pacientes que não expressaram nenhum dos genes, todos pertenciam à faixa pediátrica e todos apresentaram metástases leptomeníngeas. Os grupos são pequenos e mostram apenas tendências, e não diferenças estatísticas. Acreditamos, porém, que a classificação nestes perfis seja precisa, útil para eventuais terapias moleculares e que com a inclusão de mais pacientes, os dados possam apresentar significado estatístico.

#### **5.4.6. Expressão gênica e sobrevida**

Na literatura, autores como de Haas et al. (2006) não estabeleceram significado prognóstico para o gene *OTX2*. O presente estudo porém, mostra evidente associação do gene *OTX2* com menor sobrevida. Tal fato, aliado à constatação da associação do gene *OTX2* com o desenvolvimento de metástases, estabelece o gene *OTX2* como provável marcador de mau prognóstico.

### **5.5.Perspectivas**

Os genes *OTX1* e *OTX2* estão implicados na gênese da maioria dos meduloblastomas, alternando ou sincronizando sua ação com as demais vias tumorigênicas. O conhecimento que sua expressão pode ser inibida pela ação do ácido transretinóico faz com que a identificação dos pacientes que expressam tais genes seja fundamental, oferecendo-lhes novas perspectivas de tratamento, e eventualmente maior e melhor sobrevida.



## 6. CONCLUSÕES

- o gene *OTX1* é expresso na maioria (52%) dos meduloblastomas, e a frequência de expressão gênica aumenta com a idade. O gene *OTX1* está relacionado a meduloblastomas hemisféricos e do tipo desmoplásico; e não esteve associado a metástases leptomeníngias.
- o gene *OTX2* é expresso na maioria (62%) dos meduloblastomas. A frequência de expressão gênica está relacionada a pacientes pediátricos, e diminui com o aumento da faixa etária. O gene *OTX2* está relacionado a meduloblastomas vermianos e do tipo clássico; esteve associado ao desenvolvimento de metástases leptomeníngias e a menor sobrevida.
- A via dos genes *OTX* foi verificada na maioria dos meduloblastomas, sugerindo sua participação nos processos tumorigênicos.

## Anexo I – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética

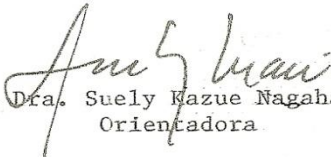


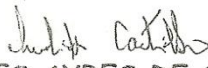
## APROVAÇÃO


A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14.06.06, **APROVOU** Protocolo de Pesquisa nº 291/06 intitulado: "Análise das características genéticas de pacientes com meduloblastoma" apresentado pelo Departamento Neurologia, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

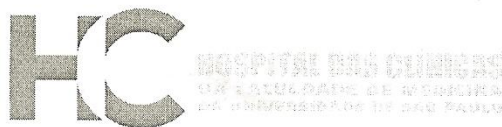
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Suely Kazue Nagashi Marie**  
 Pesquisador(a) Executante: **Valéria Marques Figueira Muio**

  
 CAPPesq, 14 de Junho de 2006.  
 Prof.ª Dra. Suely Kazue Nagashi Marie  
 Orientadora

  
**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
 Presidente da Comissão de Ética para Análise  
 de Projetos de Pesquisa

  
 Prof. Dr. Ricardo Nitrini  
 Coordenador



## CIÊNCIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24.02.10, **tomou ciência** do(s) documento(s) abaixo mencionado(s) referente ao Protocolo de Pesquisa nº **0291/06**, intitulado: “**Análise das características genéticas de pacientes com meduloblastoma**”, apresentado pelo **Departamento de Neurologia**

- ✓ Solicitação de Inclusão de mais 16 pacientes provenientes do Hospital do Câncer de Barretos, visando aumentar o valor científico do trabalho
- ✓ Relatório de Andamento do Projeto

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie**

CAPPesq, 24 de Fevereiro de 2010

**Prof. Dr. Eduardo Massad**  
**Presidente da Comissão de Ética para**  
**Análise de Projetos de Pesquisa**

**ANEXO II - PRONTUÁRIO DE PESQUISA**

<b>IDENTIFICAÇÃO</b>			
NOME			
RESPONSÁVEL			
RGHC			
LÂMINA			
GENOMA			
ENDEREÇO			
TELEFONE			
SEXO			
IDADE À CIRURGIA			
DATA NASCIMENTO		DATA DA CIRURGIA	
OBSERVAÇÕES			

<b>ASPECTOS CLÍNICOS</b>	
SINTOMAS INICIAIS	<input type="checkbox"/> CEFALÉIA <input type="checkbox"/> NÁUSEAS <input type="checkbox"/> VÔMITOS <input type="checkbox"/> INCOORDENAÇÃO <input type="checkbox"/> SONOLÊNCIA <input type="checkbox"/> ESTRABISMO <input type="checkbox"/> IRRITABILIDADE <input type="checkbox"/> DÉFICIT MOTOR <input type="checkbox"/> AUMENTO CRANIANO <input type="checkbox"/> CONVULSÕES <input type="checkbox"/> FEBRE <input type="checkbox"/> OUTROS _____
TEMPO DE EVOLUÇÃO	
COMORBIDADES	
EXAME NEUROLÓGICO	
DVP PRÉVIA	
OBSERVAÇÕES	

<b>EXAMES COMPLEMENTARES</b>	
LIQUOR INICIAL	<input type="checkbox"/> )NÃO COLHIDO <input type="checkbox"/> ) COLHIDO <input type="checkbox"/> ) LOMBAR <input type="checkbox"/> ) POSITIVO* <input type="checkbox"/> ) NEGATIVO** <input type="checkbox"/> ) VENTRICULAR <input type="checkbox"/> ) POSITIVO* <input type="checkbox"/> ) NEGATIVO** *POSITIVO PARA CÉLULAS ONCÓTICAS ** NEGATIVO PARA CÉLULAS ONCÓTICAS
TOMOGRRAFIA OU RESSONANCIA DE CRANIO INICIAL	<b>CARACTERÍSTICAS TUMORAIS</b> LOCALIZAÇÃO <input type="checkbox"/> ) VÉRMIS <input type="checkbox"/> ) HEMISFÉRIO CAPTAÇÃO DE CONTRASTE <input type="checkbox"/> ) S <input type="checkbox"/> ) N TAMANHO _____ CISTOS <input type="checkbox"/> ) S <input type="checkbox"/> ) N SANGRAMENTO <input type="checkbox"/> ) S <input type="checkbox"/> ) N CALCIFICAÇÕES <input type="checkbox"/> ) S <input type="checkbox"/> ) N DISSEMINAÇÃO LEPTOMENINGEA <input type="checkbox"/> ) S <input type="checkbox"/> ) N OUTROS _____ HIDROCEFALIA <input type="checkbox"/> ) S <input type="checkbox"/> ) N

<b>ASPECTOS CIRURGICOS</b>	
DERIVAÇÃO PRÉVIA	<input type="checkbox"/> ) S <input type="checkbox"/> ) N
DERIVAÇÃO EXTERNA INTRA OPERATÓRIA	<input type="checkbox"/> ) S <input type="checkbox"/> ) N
ABORDAGEM CIRURGICA	
GRAU DE RESSECÇÃO	<input type="checkbox"/> ) TOTAL <input type="checkbox"/> ) SUBTOTAL <input type="checkbox"/> ) PARCIAL <input type="checkbox"/> ) BIÓPSIA
ASPECTO MACROSCÓPICO	
COMPLICAÇÕES INTRA OPERATÓRIAS	<input type="checkbox"/> ) S _____ <input type="checkbox"/> ) N
OBSERVAÇÕES	

<b>ASPECTOS PÓS OPERATÓRIOS</b>	
COMPLICAÇÕES CIRURGICAS	
COMPLICAÇÕES CLÍNICAS	
COMPLICAÇÕES INFECCIOSAS	
COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS	
DIAS DE UTI	
DIAS DE INTERNAÇÃO	
DERIVAÇÃO DEFINITIVA	( )S ( )N
CONDIÇÕES DE ALTA	
EXAMES PÓS OPERATÓRIOS	( )TOMOGRAFIA ( )RESSONÂNCIA
TAIS EXAMES CORROBORAM RESSECÇÃO	( ) TOTAL ( ) SUBTOTAL ( ) PARCIAL ( ) BIÓPSIA

<b>ASPECTOS PATOLÓGICOS</b>	
DIAGNÓSTICO	
TIPO HISTOLÓGICO	
REVISÃO DE LÂMINA	

<b>TRATAMENTO COMPLEMENTAR</b>	
QUIMIOTERAPIA	( )S ( )N_____
	TEMPO ENTRE CIRURGIA E INICIO DA QUIMIOTERAPIA_____
	NÚMERO DE CICLOS_____
	DROGAS_____
	COMPLICAÇÕES_____
RADIOTERAPIA	( )S( )N_____
	TEMPO ENTRE CIRURGIA E INICIO DA RADIOTERAPIA_____
	NÚMERO DE CICLOS_____
	DOSE_____

<b>SEGUIMENTO AMBULATORIAL</b>	
TEMPO DE SEGUIMENTO EM MESES	
TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA EM MESES	
VIVO ATUALMENTE(DEZEMBRO/2009)	( )S ( )N
ULTIMOS EXAMES DE IMAGEM DATA : _____	( ) TOMOGRAFIA DE CRÂNIO
	( ) RESSONANCIA DE CRÂNIO
	( ) ESTUDO DE NEUROEIXO
ULTIMOS EXAMES DE LCR	
EXAMES ATUAIS DATA: _____	( ) LCR
	( ) TOMOGRAFIA DE CRÂNIO
	( ) RESSONANCIA DE CRÂNIO
	( ) ESTUDO DE NEUROEIXO
STATUS CLÍNICO ATUAL	
REOPERAÇÃO	( )N ( )S _____ _____
DISSEMINAÇÃO LEPTOMENÍNGEA	( )S ( )N
DISSEMINAÇÃO EXTRANEURAL	( )S ( )N
ESCAPE TERAPÊUTICO	( )S ( )N
CAUSA MORTIS	

OBSERVAÇÕES	
-------------	--

<b>ESTUDO GENÉTICO</b>	
EXPRESSÃO <i>OTX1</i>	
EXPRESSÃO <i>OTX2</i>	
GENÓTIPO	<input type="checkbox"/> <i>OTX1+OTX2-</i>
	<input type="checkbox"/> <i>OTX1-OTX2+</i>
	<input type="checkbox"/> <i>OTX1+OTX2+</i>
	<input type="checkbox"/> <i>OTX1-OTX2-</i>



## ANEXO III

Planilha 1: Nome, Registro hospitalar, número genoma(n), expressão *OTX1* em número absoluto e sim/não e expressão *OTX2* em número absoluto e sim/não

NOME	RGHC	N	<i>OTX1</i>	<i>OTX1</i> (Val )	<i>OTX2</i>	<i>OTX2</i> (Val)
AFS	13518314 H	32	243,83	S	0,84	N
EAC	2801402D	40	29,42	S	0,00	N
BSA	3355923I	46	0,00	N	147,58	S
DOP	13529980 K	58	0,00	N	91,35	S
BDS	13533536 E	75	0,00	N	41,51	S
GAS	13538062F	85	1572,91	S	1,11	N
MPV	13557885 B	168	0,00	N	79,66	S
RGS	3222140A	311	87,66	S	0,00	N
JSP	13581576F	374	111,32	S	0,00	N
SCB	13471846 E	409	24,33	S	22,10	S
RBT	13473115 K	417	0,00	N	61,63	S
MRSB	13473548 E	420	66,05	S	11,81	S
LSP	13483694F	460	0,00	N	41,19	S
CCS	13487458 B	486	10,31	S	73,13	S
QRSC	44204134 E	519	0,00	N	123,14	S
CACL	77068274 K	615	1398,89	S	0,01	N
SAF	3098259D	670	839,55	S	0,14	N
JPCPC	13616839 B	673	5,40	N	39,00	S
LPC	13615755I	677	0,00	N	5,40	S
GSS	13629331I	741	0,59	N	0,00	N
GHKFS	3363119I	745	0,78	N	70,59	S
SAAS	13629851 E	746	6,65	N	48,16	S
GVRs	13634759I	767	0,00	N	63,84	S
VSM	6109085C	883	291,50	S	15,02	S
VCSJ	13668221 H	909	1,77	N	135,28	S
JSP	13673059 G	926	0,51	N	57,22	S
CLCMS	13686030 A	973	1278,53	S	91,89	S
NPS	13687191F	979	321,40	S	0,89	N
DFNB	13694504 A	1001	34,22	S	124,36	S
GVSG	13698445 E	1022	827,58	S	2,02	S
RGP	13711605 H	1062	2,48	N	54,90	S
VHPM	13715904J	1078	38,70	S	1,41	N
FFS	2998005I	1087	2087,90	S	0,02	N
WRL	13722180I	1094	35,58	S	2,13	N

LMC	3141909E	1105	0,00	N	0,01	N
FSC	13735213 B	1138	5,56	N	0,78	N
DDMR	6130218G	1211	0,00	N	132,51	S
GBS	6134615G	1269	0,00	N	161,38	S
BHGM	77088635 E	1311	249,00	S	98,46	S
RSS	13847162 B	1343	794,32	S	16,62	S
FJS	13858431 K	1356	4461,72	S	0,00	N
BAS	6157048C	1377	8,78	N	8,79	S
GCB	13556389 A	1378	0,00	N	0,00	N
RBS	BR	RH0801141	1111,24	S	2,11	S
MEBR	BR	RH0802093	0,00	N	3,29	S
MJBM	BR	RH0804151	0,00	N	130,76	S
FWID	BR	RH0804439	12,75	S	0,02	N
IJSP	BR	RH0805338	0,00	N	133,96	S
RRS	BR	RH0805604	156,27	S	0,71	N
WHAF	BR	RH0809579	1441,37	S	0,19	N
LHO	BR	RH0607316	0,00	N	145,97	S
RGO	BR	RH00703168	109,487	S	259,	S
G			1		8	
JCGS	BR	RH0610382	691,01	S	0,23	N
MHGS	BR	RH0616226	57,50	S	0,03	N
MGVRF	BR	RH0711477	1611,36	S	110,70	S
JVL	BR	RH0713109	18,45	S	139,30	S
NAR	BR	RH0810100	1697,50	S	0,00	N
DBS	BR	RH0812041	4,89	N	58,73	S
ARM	13499614 E	520/1047	801,50	S	0,40	N
MV	SM	MVS	0,00	N	145,70	S
		pool cerebello	0,00		0,39	
		USA				
		cerebello 1	0,14		1,27	
		cerebello 2	0,00		1,61	
		cerebello 3	7,05		1,26	

Planilha 2: Nome , registro hospitalar, data de nascimento, sexo, idade ao diagnóstico e sintomas iniciais

NOME	RGHC	DN	SEXO	ID DX	SINTOMAS
AFS	13518314H	11/02/1961	M	39a6m	SONOLENCIA E INCOORDENAÇÃO
EAC	2801402D	04/11/1975	F	25a1m	CEFALÉIA, DIPLOPLIA E INCOORDENAÇÃO
BSA	3355923I	11/11/1988	F	12a1m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
DOP	13529980K	18/12/1993	M	7a6m	CEFALÉIA, INCOORDENAÇÃO E PERDA VISUAL
BDS	13533536E	02/03/1999	F	2a7m	INCOORDENAÇÃO E PARAPRESIA
GAS	13538062F	23/03/1997	F	3a10m	CEFALÉIA E VÔMITOS
MPV	13557885B	25/08/1991	M	10a1m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
RGS	3222140A	24/04/1982	M	17a4m	CEFALEIA E INCOORDENACAO
JSP	13581576F	04/01/1970	F	32a9m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
SCB	13471846E	12/04/2001	M	1A8m	DESEQUILIBRIO E TORCICOLO
RBT	13473115K	28/08/2002	F	0a10m	QUEDA DO ESTADO GERAL
MRSB	13473548E	30/03/1972	M	30a9m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
LSP	13483694F	27/11/1971	F	31a3m	CEFALÉIA
CCS	13487458B	15/01/1978	M	25a3m	CEFALÉIA E VÔMITOS
QRSC	44204134E	08/05/1996	F	7a1m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
CACL	77068274K	27/01/1971	M	32a8m	CEFALÉIA E VERTIGEM
SAF	3098259D	27/01/1990	F	13a11m	INCOORDENAÇÃO E VÔMITOS
JPCPC	13616839B	23/11/2001	M	2a2m	VÔMITOS E INCOORDENAÇÃO
LPC	13615755I	29/08/1993	F	10a5m	CEFALÉIA E SONOLÊNCIA
GSS	13629331I	04/10/1990	M	13a7m	CEFALÉIA , VÔMITOS E INCOORDENAÇÃO
GHKFS	3363119I	08/04/1998	M	6a0m	INCOORDENAÇÃO
SAAS	13629851E	15/03/1968	F	36a1m	INCOORDENAÇÃO , PARAPRESIA E PERDA VISUAL
GURS	13634759I	13/10/1999	F	4a7m	INCOORDENAÇÃO E TREMOR
VSM	6109085C	04/04/2004	F	8m	QUEDA DO ESTADO GERAL
VCSJ	13668221H	02/03/1998	F	6a10m	CEFALÉIA, VÔMITOS E ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL
JSP	13673059G	23/03/1993	M	11a11m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
CLCMS	13686030A	21/01/2000	M	5a3m	ESTRABISMO E ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL
NPS	13687191F	03/05/1976	M	29a0m	CEFALÉIA E VÔMITOS

DFNB	13694504A	03/06/1987	F	18a1m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
GVSG	13698445E	16/06/1998	M	7a2m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
RGP	13711605H	04/08/1987	M	18a3m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
VHPM	13715904J	10/03/1988	M	17a9m	CEFALÉIA, VÔMITOS E ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL
FFS	2998005I	29/07/1974	M	31a5m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
WRL	13722180I	16/05/1983	M	22a8m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
LMC	3141909E	23/02/1970	M	25	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
FSC	13735213B	07/04/2003	M	3a1m	INCOORDENAÇÃO, ESTRABISMO E TORCICOLO
DDMR	6130218G	03/12/2001	F	5a1m	CEFALÉIA , VÔMITOS E INCOORDENAÇÃO
GBS	6134615G	03/08/2004	M	2a9m	QUEDA DO ESTADO GERAL
BHGM	77088635E	11/11/2000	M	6a10m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
RSS	13847162B	28/11/1976	M	31a10m	CEFALÉIA , E INCOORDENAÇÃO
FJS	13858431K	27/08/1979	M	29a4m	INCOORDENAÇÃO E CEFALÉIA
BAS	6157048C	26/04/2008	F	1a0m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
GCB	13556389A	01/12/1983	F	17a10m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
RBS	BR	12/07/1979	M	29a10m	CEFALEIA E INCOORDENACAO
MEBR	BR	18/12/2001	F	6a2m	CEFALEIA E TETRAPRESIA
MJBM	BR	05/01/2004	F	4a3m	INCOORDEBACAOE CEFALEIA
FWID	BR	03/12/1974	M	33a4m	INCOORDENACAO E E VERTIGEM
IJSP	BR	17/07/1998	F	9a10m	CEFALEIA E ATAXIA
RRS	BR	03/04/1960	m	48A2M	CEFALEIA E INCOORDENACAO
WHAF	BR	07/07/1982	M	26a2m	CEFALEIA E VOMITOS
LHO	BR	17/07/1998	F	7a10m	CAFALEIA E VOMITOS
<b>RGOG</b>	BR	30583	F	23a7m	CEFALEIA E DIPLOPIA
JCGS	BR	06/11/1996	M	9a9m	CEFALEIA
MHGS	BR	24/04/1998	M	8a8m	CEFALEIA
MGVRF	BR	13/03/1999	M	8a7m	ESTRABISMO
JVL	BR	16/07/2000	M	10a6m	CEFALÉIA E INCOORDENAÇÃO
NAR	BR	24/08/1982	M	26a1m	CEFALEIA E INCOORDENACAO
DBS	BR	21/04/1988	M	20a6m	CEFALEIA E DIPLOPIA
ARM	13499614E	11/07/1972	M	30a11m	DIPLOPIA E INCOORDENAÇÃO
MV	SM	05/04/2002	M	7a2m	CEFALEIA E INCOORDENACAO

Planilha 3: Nome, registro hospitalar, topografia tumoral, tipo hidrológico, presença de hidrocefalia(HCF) e disseminação inicial

NOME	RGHC	LOCALIZAÇÃO	TIPO DE MEDULO	HCF	DISSEMINAÇÃO INICIAL/ (IMAGEM/LCR)
AFS	13518314H	VERMIS	CLASSICO	S	N
EAC	2801402D	HEMISFERIO	CLASSICO	S	N
BSA	3355923I	VERMIS	CLASSICO	S	S
DOP	13529980K	VERMIS	CELS GIGANTES	S	N
BDS	13533536E	VERMIS	CLASSICO	S	S
GAS	13538062F	VERMIS	EXTENSA	S	N
			NODULARIDADE		
MPV	13557885B	VERMIS	CLASSICO	S	N
RGS	3222140A	HEMISFERIO	CLASSICO	S	N
JSP	13581576F	VERMIS	CELS GIGANTES	S	N
SCB	13471846E	VERMIS	CLASSICO	S	S
RBT	13473115K	VERMIS	CLASSICO	S	N
MRSB	13473548E	HEMISFERIO	CLASSICO	N	N
LSP	13483694F	VERMIS	CLASSICO	S	N
CCS	13487458B	VERMIS	CLASSICO	S	N
QRSC	44204134E	VERMIS	CLASSICO	S	N
CACL	77068274K	HEMISFERIO	CLASSICO	N	N
SAF	3098259D	HEMISFERIO	DESMOPLASICO	S	N
JPCPC	13616839B	VERMIS	CELS GIGANTES	S	N
LPC	13615755I	VERMIS	CLASSICO	S	N
GSS	13629331I	HEMISFERIO	CELS GIGANTES	N	N
GHKFS	3363119I	VERMIS	CLASSICO	S	N
SAAS	13629851E	VERMIS	CLASSICO	S	N
GVRS	13634759I	VERMIS	CLASSICO	S	N
VSM	6109085C	VERMIS	CLASSICO	S	N
VCSJ	13668221H	VERMIS	CELS GIGANTES	S	N
JSP	13673059G	VERMIS	CLASSICO	S	N
CLCMS	13686030A	VERMIS	CLASSICO	S	N
NPS	13687191F	VERMIS	CLASSICO	S	N
DFNB	13694504ª	VERMIS	DESMOPLASICO	S	N

GVSG	13698445E	VERMIS	EXTENSA	S	N
			NODULARIDADE		
RGP	13711605H	VERMIS	CLASSICO	S	N
VHPM	13715904J	VERMIS	CLASSICO	S	N
FFS	2998005I	VERMIS	DESMOPLASICO	S	N
WRL	13722180I	HEMISFERIO	CLASSICO	S	N
LMC	3141909E	HEMISFERIO	DESMOPLASICO	S	N
FSC	13735213B	VERMIS	EXTENSA	S	N
			NODULARIDADE		
DDMR	6130218G	VERMIS	CLASSICO	S	N
GBS	6134615G	VERMIS	CELS GIGANTES	S	S
BHGM	77088635E	VERMIS	CLASSICO	S	N
RSS	13847162B	HEMISFERIO	DESMOPLASICO	N	N
FJS	13858431K	HEMISFERIO	CLASSICO	S	N
BAS	6157048C	VERMIS	DESMOPLASICO	N	S
GCB	13556389A	VERMIS	ANAPLÁSICO	N	N
RBS	BR	VERMIS	CLASSICO	S	N
MEBR	BR	VERMIS	CLASSICO	S	S
MJBM	BR	VERMIS	CLASSICO	S	N
FWID	BR	HEMISFERIO	DESMOPLASICO	N	S
IJSP	BR	VERMIS	CLASSICO	N	N
RRS	BR	VERMIS	CLASSICO	S	N
WHAF	BR	HEMISFERIO	DESMOPLASICO	S	N
LHO	BR	VERMIS	CLASSICO	S	S
RGOG	BR	VERMIS	CLASSICO	S	N
JCGS	BR	HEMISFERIO	DESMOPLASICO	S	N
MHGS	BR	HEMISFERIO	DESMOPLASICO	S	S
MGVRF	BR	VERMIS	CLASSICO	S	N
JVL	BR	VERMIS	CLASSICO	S	N
NAR	BR	VERMIS	CLASSICO	S	N
DBS	BR	VERMIS	CLASSICO	S	N
ARM	13499614E	HEMISFERIO	DESMOPLASICO	S	N
MV	SM	VERMIS	CLASSICO	N	N

Planilha 4: nome, registro hospitalar, grau de ressecção , presença de derivação ventriculoperitoneal definitiva, quimioterapia, radioterapia

NOME	RGHC	GRAU DE RESSECÇÃO DADA PELO	DVP	QT	RXT
		CIRURGIÃO			
AFS	13518314H	SUBTOTAL	S	S	S
EAC	2801402D	TOTAL(1)TOTAL(2)	S	S	S
BSA	3355923I	SUBTOTAL	S	S	S
DOP	13529980K	TOTAL	N	S	S
BDS	13533536E	SUBTOTAL	S	S	N
GAS	13538062F	TOTAL	N	S	S
MPV	13557885B	TOTAL	N	S	S
RGS	3222140A	TOTAL	S	S	S
JSP	13581576F	TOTAL	N	S	S
SCB	13471846E	TOTAL	S	S	N
RBT	13473115K	TOTAL	S	S	N
MRSB	13473548E	TOTAL	N	S	S
LSP	13483694F	SUBTOTAL	S	S	S
CCS	13487458B	TOTAL	S	S	S
QRSC	44204134E	SUBTOTAL	N	S	S
CACL	77068274K	TOTAL	N	S	S
SAF	3098259D	TOTAL	N	S	S
JPCPC	13616839B	SUBTOTAL	S	S	N
LPC	13615755I	TOTAL	S	S	S
GSS	13629331I	TOTAL	N	N	N
GHKFS	3363119I	TOTAL	N	S	S
SAAS	13629851E	TOTAL	N	S	S
GVRs	13634759I	SUBTOTAL	N	S	S
VSM	6109085C	TOTAL	S	S	N
VCSJ	13668221H	TOTAL	S	N	N
JSP	13673059G	SUBTOTAL	S	S	S
CLCMS	13686030A	SUBTOTAL	S	S	S
NPS	13687191F	TOTAL	S	S	S
DFNB	13694504A	TOTAL	S	S	S
GVSG	13698445E	INCHAÇO CEREBRAL	S	N	N
RGP	13711605H	TOTAL	S	N	N

VHPM	13715904J	TOTAL	N	S	S
FFS	2998005I	TOTAL	S	S	S
WRL	13722180I	TOTAL	N	S	N
LMC	3141909E	TOTAL	S	S	S
FSC	13735213B	TOTAL(1); SUBTOTAL(2)	S	S	S
DDMR	6130218G	TOTAL	S	S	S
GBS	6134615G	PARCIAL	S	S	S
BHGM	77088635E	TOTAL	N	S	S
RSS	13847162B	TOTAL	S	S	S
FJS	13858431K	TOTAL	N	S	S
BAS	6157048C	TOTAL	S	S	N
GCB	13556389A	TOTAL(1); SUBTOTAL(2)	N	S	S
RBS	BR	TOTAL	N	S	S
MEBR	BR	BIOPSIA	S	S	S
MJBM	BR	SUBTOTAL	S	S	S
FWID	BR	SUBTOTAL	N	S	S
IJSP	BR	SUBTOTAL	S	S	S
RRS	BR	SUBTOTAL	S	S	S
WHAF	BR	TOTAL	S	S	S
LHO	BR	PARCIAL	S	S	S
RGOG	BR	TOTAL	S	S	S
JCGS	BR	TOTAL	N	S	S
MHGS	BR	SUBTOTAL	S	S	S
MGVRF	BR	SUBTOTAL	N	S	S
JVL	BR	TOTAL	N	S	S
NAR	BR	SUBTOTAL	S	S	S
DBS	BR	SUBTOTAL	S	S	S
ARM	13499614E	TOTAL	N	S	S
MV	SM	TOTAL	N	S	S



Planilha 5: nome, registro hospitalar, tempo se seguimento(follow up) ,  
sobrevida, intervalo de recidiva e reoperação

NOME	RGHC	FOLLOW UP (m)	SOBREVIDA (m)	Δ RECIDIVA (m)	# reop
AFS	13518314 H	96	115	N	N
EAC	2801402D	54	48	36	SIM(TUMOR CISTICO)
BSA	3355923I	6	79	PROGRESSÃO DIRETA	N
DOP	13529980K	18	17	10	N
BDS	13533536E	8	6	PROGRESSÃO DIRETA	N
GAS	13538062F	96	110	N	N
MPV	13557885B	48	49	48	N
RGS	3222140A	40	40	36	N
JSP	13581576F	86	87	N	N
SCB	13471846E	18	25	6	N
RBT	13473115K	18	31	6	N
MRSB	13473548E	48	24	36	N
LSP	13483694F	24	25	6	N
CCS	13487458B	25	26	24	N
QRSC	44204134E	78	81	N	N
CACL	77068274K	74	74	N	N
SAF	3098259D	72	74	N	N
JPCPC	13616839B	24	25	12	N
LPC	13615755I	70	73	N	N
GSS	13629331I	1	0	PROGRESSÃO DIRETA	N
GHKFS	3363119I	66	70	N	N
SAAS	13629851E	67	70	N	N
GVRs	13634759I	66	69	N	N
VSM	6109085C	12	12	PROGRESSÃO DIRETA	N
VCSJ	13668221 H	2m	2	PROGRESSÃO DIRETA	N
JSP	13673059 G	58	61	48	N
CLCMS	13686030A	24	25	20	N
NPS	13687191F	55	58	N	N
DFNB	13694504A	24	56	N	N
GVSG	13698445E	obito	0	N	N

<b>RGP</b>	13711605	12	12	12	N
	H				
VHPM	13715904J	48	51	N	N
FFS	2998005I	46	50	N	N
WRL	13722180I	6	6	N	N
LMC	3141909E	144	144	24	S(2)
FSC	13735213B	42	45	12	S(1)
DDMR	6130218G	22	38	N	N
GBS	6134615G	9	11	PROGRESSÃO	N
				DIRETA	
BHGM	77088635E	26	27	N	N
RSS	13847162B	14	14	N	N
FJS	13858431K	11	11	n	N
BAS	6157048C	8	8	N	N
GCB	13556389A	96	99	96	S(2)
RBS	BR	22	22	N	N
MEBR	BR	20	20	PROGRESSÃO	N
				DIRETA	
MJBM	BR	9	9	N	N
FWID	BR	6	6	N	N
IJSP	BR	10	10	N	N
RRS	BR	18	18	N	N
WHAF	BR	14	14	N	N
LHO	BR	29	29	N	N
<b>RGO</b>	<b>BR</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
	<b>G</b>				
JCGS	BR	40	40	N	N
MHGS	BR	20	20	PROGRESSÃO	N
				DIRETA	
MGVRF	BR	31	31	N	N
JVL	BR	24	24	N	N
NAR	BR	13	13	N	N
DBS	BR	1	1	N	N
ARM	13499614E	81	81	N	1
MV	SM	6	6	N	N

**BIBLIOGRAFIA**

Abacioglu U, Hotel O, Sengoz M, Turkan S, Ober A. Medulloblastoma in adults: treatment results and prognostic factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002 Nov 1; 54(3): 855-60.

Acampora D, Gulisano M, Simeone A. Otx genes and the genetic control of brain morphogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 1999 Jan;13(1): 1-8.

Acampora D, Gulisano M, Broccoli V, Simeone A. Otx genes in brain morphogenesis. *Prog Neurobiol*. 2001 May;64(1): 69-95.

Acampora D, Annino A, Puellas E, Alfano I, Tuorto F, Simeone A. *OTX1* compensates for *OTX2* requirement in regionalisation of anterior neuroectoderm. *Gene Expr Patterns*. 2003 Aug; 3 (4):497-501.

Adamson DC, Shi Q, Wortham M, Northcott PA, Di C, Duncan CG, Li J, McLendon RE, Bigner DD, Taylor MD, Yan H. *OTX2* is critical for the maintenance and progression of Shh-independent medulloblastomas. *Cancer Res*. 2010 Jan 1; 70(1):181-91.

Adesina AM, Dunn ST, Moore WE, Nalbantoglu J. Expression of p27kip1 and p53 in medulloblastoma: relationship with cell proliferation and survival. *Pathol Res Pract*. 2000;196(4): 243-50.

Akagi T, Mandai M, Ooto S, Hiram Y, Osakada F, Kageyama R, Yoshimura N, Takahashi M. *OTX2* homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Dec; 45 (12):4570-5.

Akay KM, Izci Y, Baysefer A, Atabey C, Kismet E, Timurkaynak E. Surgical outcomes of cerebellar tumors in children. *Pediatr Neurosurg*. 2004 Sep-Oct;40(5): 220-5.

Albright, AL; Wisoff, JH; Zeltzer, PM. Effects os medulloblastoma resections on outcome in children: report from the Children's Cancer Study Group. *Neurosurgery* 1996; 38: 265-71.

Allen J, Donahue B, Mehta M, Miller DC, Rorke LB, Jakacki R, Robertson P, Sposto R, Holmes E, Vezina G, Muraszko K, Puccetti D, Prados M, Chan KW. A phase II study of preradiotherapy chemotherapy followed by hyperfractionated radiotherapy for newly diagnosed high-risk medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor: a report from the Children's Oncology Group (CCG 9931). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Jul 15; 74(4): 1006-11.

Ando K, Yagi H, Suda Y, Aizawa S, Sakashita M, Nagano T, Terashima T, Sato M. Establishment of framework of the cortical area is influenced by *OTX1*. *Neurosci Res*. 2008 Apr; 60 (4): 457-9.

Ang C, Hauerstock D, Guiot MC, Kasymjanova G, Roberge D, Kavan P, Muanza T. Characteristics and outcomes of medulloblastoma in adults. *Pediatr Blood Cancer*. 2008 Nov; 51(5): 603-7.

Back, M Franzcr, GradDipPsyOnc 1; Ahern, V Franzcr 2; Berry, M Franzcr 2; Borg, M Franzcr 2; Sexton, M Franzcr 2; Cameron, F Franzcr 2; Stevens, G MD, Franzcr 2; Allison, R Franzcr 2; Childs, J Franzcr 2; Barton, M Franzcr . Importance of radiation time and dose factors on outcome for childhood medulloblastoma. *Australasian Radiology*. 2005 August ; 49(4): 298-303.

Bailey P, Cushing H. Medulloblastoma cerebelli: a common type of midcerebellar glioma of childhood. *Arch Neurol Psychiatry* 1925;14:192-224.

Bar EE, Chaudhry A, Farah MH, Eberhart CG. Hedgehog signaling promotes medulloblastoma survival via Bc/II. *Am J Pathol.* 2007 Jan;170 (1): 347-55.

Barker N. The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway. *Methods Mol Biol.* 2008; 468:5-15.

Barth AI, Pollack AL, Altschuler Y, Mostov KE, Nelson WJ. NH<sub>2</sub>-terminal deletion of beta-catenin results in stable colocalization of mutant beta-catenin with adenomatous polyposis coli protein and altered MDCK cell adhesion. *J Cell Biol.* 1997 Feb 10; 136 (3):693-706.

Behesti H, Marino S. Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Mar; 41(3):435-45.

Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science.* 2002 Aug 30; 297(5586): 1559-61.

Biegel JA, Rorke LB, Packer RJ, Sutton LN, Schut L, Bonner K, Emanuel BS. Isochromosome 17q in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Genes Chromosomes Cancer.* 1989 Nov; 1(2): 139-47.

Blatt J, Penchansky L, Phebus C, Horn M. Leukemia in a child with a history of medulloblastoma. *Pediatr Hematol Oncol.* 1991 Jan-Mar; 8(1): 77-82.

Bobola N, Briata P, Ilengo C, Rosatto N, Craft C, Corte G, Ravazzolo R. *OTX2* homeodomain protein binds a DNA element necessary for interphotoreceptor retinoid binding protein gene expression. *Mech Dev.* 1999 Apr; 82(1-2): 165-9.

Bolós V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL (May 2007). Notch signaling in development and cancer. *Endocr. Rev.* 28 (3): 339–63.

Boncinelli E, Morgan R. Downstream of *OTX2*, or how to get a head. *Trends Genet.* 2001 Nov; 17(11): 633-6.

Brandes AA, Paris MK, Basso U. Medulloblastomas: do molecular and biologic markers indicate different prognoses and treatments? *Expert Rev Anticancer Ther.* 2003 Oct; 3(5): 615-20.

Brossard J, Abish S, Bernstein ML, Baruchel S, Kovacs L, Pollack R. Maternal malignancy involving the products of conception: a report of malignant melanoma and medulloblastoma. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1994 Nov; 16(4): 380-3. 2001 Nov; 17(11): 633-6.

Boon, Kathy 1; Edwards, Jennifer B 1; Siu, I-Mei 1; Olschner, Deric 1; Eberhart, Charles G 2; Marra, Marco A 3; Strausberg, Robert L 4; Riggins, Gregory J. Comparison of medulloblastoma and normal neural transcriptomes identifies a restricted set of activated genes. *Oncogene.* 2003 October 22 (48): 7687-7694.

Boon K, Eberhart CG, Riggins GJ. Genomic amplification of orthodenticle homologue 2 in medulloblastomas. *Cancer Res.* 2005 Feb 1; 65(3) : 703-7.

Boyl PP, Signore M, Annino A, Barbera JP, Acampora D, Simeone A. *Otx* genes in the development and evolution of the vertebrate brain. *Int J Dev Neurosci.* 2001 Jul; 19(4): 353-63.

Brandes AA, Paris MK, Basso U. Medulloblastomas: do molecular and biologic markers indicate different prognoses and treatments? *Expert Rev Anticancer Ther.* 2003 Oct; 3 (5): 615-20.

Briggs KJ, Corcoran-Schwartz IM, Zhang W, Harcke T, Devereux WL, Baylin SB, Eberhart CG, Watkins DN. Medulloblastoma. *Genes Dev.* 2008 Mar 15; 22(6):770-85. Erratum in: *Genes Dev.* 2008 May 15; 22(10):1410.

Broccoli V, Boncinelli E, Wurst W. The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmus organizer. *Nature.* 1999 Sep 9; 401 (6749): 164-8.

Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell.* February 2005 (2): 207–16.

Bussab, W.O.; Morettin, P.A. *Estatística Básica.* 5. ed. São Paulo: Saraiva, 2006.

Carlotti CG Jr, Smith C, Rutka JT. The molecular genetics of medulloblastoma: an assessment of new therapeutic targets. *Neurosurg Rev.* 2008 Oct; 31(4): 359-68; discussion 368-9.

Carlotti CG Jr, Smith C, Rutka JT. The molecular genetics of medulloblastoma: an assessment of new therapeutic targets. *Neurosurg Rev.* 2008 Oct; 31(4): 359-68; discussion 368-9.

Chamberlain MC, Silver P, Edwards MS, Levin VA. Treatment of extraneural metastatic medulloblastoma with a combination of cyclophosphamide, adriamycin, and vincristine. *Neurosurgery.* 1988 Oct; 23(4): 476-9.

Chang CH; Housepian, EM, Herbert C Jr. An operative staging system and a megavoltage technic for cerebellar medulloblastomas. *Radiology* 1969; 93:1351-9.

Chang Q, Chen Z, You J, McNutt MA, Zhang T, Han Z, Zhang X, Gong E, Gu J. All-trans-retinoic acid induces cell growth arrest in a human medulloblastoma cell line. *J Neurooncol.* 2007 Sep; 84(3): 263-7.

Chintagumpala, Murali MD; Berg, Stacey MD; Blaney, Susan M. MD Treatment controversies in medulloblastoma. *Current Opinion in Oncology,* May 2001, 13(3): 154-159.

Chopra A, Brown KM, Rood BR, Packer RJ, MacDonald TJ. The use of gene expression analysis to gain insights into signaling mechanisms of metastatic medulloblastoma. *Pediatr Neurosurg.* 2003 Jul; 39 (2): 68-74.

Cohen MM Jr. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A.* 2003 Nov 15; 123A (1): 5-28.

Collet, D. *Modelling Survival Data in Medical Research*, 2.ed. Chapman & Hall/CRC, 2003.

Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol.* 2007 Dec; 6 (12): 1073-85.

Curran EK, Le GM, Sainani KL, Propp JM, Fisher PG. Do children and adults differ in survival from medulloblastoma? A study from the SEER registry. *J Neurooncol.* 2009 Oct; 95 (1): 81-5.

Danesin C, Peres JN, Johansson M, Snowden V, Cording A, Papalopulu N, Houart C. Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1. *Dev Cell.* 2009 Apr; 16 (4): 576-87.

Da Silva, R. *Envolvimento da  $\beta$  catenina na via WNT em medulloblastoma: estudo molecular e imunohistoquímico [dissertação].* São Paulo:Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007, 107p.



de Haas T, Oussoren E, Grajkowska W, Perek-Polnik M, Popovic M, Zadavec-Zaletel L, Perera M, Corte G, Wirths O, van Sluis P, Pietsch T, Troost D, Baas F, Versteeg R, Kool M. OTX1 and OTX2 expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Feb; 65 (2): 176-86.

de Haas TG, Kool M. Clinicopathological features of medulloblastoma: an overview with an emphasis on molecular biology. *Clin Neuropathol*. 2007 May-Jun; 26 (3): 93-110.

Di C, Liao S, Adamson DC, Parrett TJ, Broderick DK, Shi Q, Lengauer C, Cummins JM, Velculescu VE, Fults DW, McLendon RE, Bigner DD, Yan H. Identification of OTX2 as a medulloblastoma oncogene whose product can be targeted by all-trans retinoic acid. *Cancer Res*. 2005 Feb 1; 65 (3): 919-24.

Di Marcotullio L, Ferretti E, De Smaele E, Screpanti I, Gulino A. Suppressors of hedgehog signaling: Linking aberrant development of neural progenitors and tumorigenesis. *Mol Neurobiol*. 2006 Dec; 34 (3): 193-204.

Dong J., Gailani M. R., Pomeroy S. L., Reardon D., Bale A. E. Identification of *PATCHED* mutations in medulloblastomas by direct sequencing. *Hum. Mutat.*, 2000 ; 16: 89-90.

Duffner PK, Krischer JP, Horowitz ME, Cohen ME, Burger PC, Friedman HS, Kun LE. Second malignancies in young children with primary brain tumors following treatment with prolonged postoperative chemotherapy and delayed irradiation: a Pediatric Oncology Group study. *Ann Neurol*. 1998 Sep; 44 (3): 313-6.

Duman-Scheel M., Weng L., Xin S., Du W. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing cyclin D and cyclin E. *Nature (Lond.)*, 2002;417: 299-304.

Eberhart CG, Kepner JL, Goldthwaite PT, Kun LE, Duffner PK, Friedman HS, Strother DR, Burger PC. Histopathologic grading of medulloblastomas: a Pediatric Oncology Group study. *Cancer*. 2002 Jan 15; 94 (2): 552-60.

Eberhart CG, Cohen KJ, Tihan T, Goldthwaite PT, Burger PC. Medulloblastomas with systemic metastases: evaluation of tumor histopathology and clinical behavior in 23 patients. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003 Mar; 25(3): 198-203.

Eberhart CG, Kratz J, Wang Y, Summers K, Stearns D, Cohen K, Dang CV, Burger PC. Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and anaplasia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 May; 63 (5): 441-9.

Eberhart CG. In search of the medulloblast: neural stem cells and embryonal brain tumors. *Neurosurg Clin N Am*. 2007 Jan; 18(1 ) :59-69, viii-ix.

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 1993 Dec 31; 75 (7): 1417-30.

Ellison,D. Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathology and Applied Neurobiology* (2002), 257-82.

Engelhard HH, Corsten LA. Leptomeningeal metastasis of primary central nervous system (CNS) neoplasms. *Cancer Treat Res*. 2005; 125:71-85.

Ertan Y, Sezak M, Demirağ B, Kantar M, Cetingül N, Turhan T, Erşahin Y, Mutluer S, Anacak Y, Akalin T. Medulloblastoma: clinicopathologic evaluation of 42 pediatric cases. *Childs Nerv Syst.* 2009 Mar; 25 (3): 353-6.

Etzell JE, Keet C, McDonald W, Banerjee A. Medulloblastoma simulating acute myeloid leukemia: case report with a review of "myeloid antigen" expression in nonhematopoietic tissues and tumors. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2006 Nov; 28 (11): 703-10.

Fearnhead N. S., Britton M. P., Bodmer W. F. The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.*, 2001 10: 721-733.

Feiden S, Feiden W. WHO classification of tumours of the CNS: revised edition of 2007 with critical comments on the typing und grading of common-type diffuse gliomas. *Pathologe.* 2008 Nov; 29 (6): 411-21.

Ferrante L, Mastronardi L, Celli P, Acqui M, Cervoni L, Fortuna A. Medulloblastoma in adulthood. *J Neurosurg Sci.* 1991 Jan-Mar; 35 (1):23-30.

Ferretti E, De Smaele E, Di Marcotullio L, Screpanti I, Gulino A. Hedgehog checkpoints in medulloblastoma: the chromosome 17p deletion paradigm. *Trends Mol Med.* 2005 Dec; 11 (12):537-45.

Fiorilli P, Partridge D, Staniszevska I, Wang JY, Grabacka M, So K, Marcinkiewicz C, Reiss K, Khalili K, Croul SE. Integrins mediate adhesion of medulloblastoma cells to tenascin and activate pathways associated with survival and proliferation. *Lab Invest.* 2008 Nov; 88 (11):1143-56.

Frantz GD, Weimann JM, Levin ME, McConnell SK. Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. *J Neurosci.* 1994 Oct;14 (10):5725-40.

Fuller GN, Su X, Price RE, Cohen ZR, Lang FF, Sawaya R, Majumder S. Many human medulloblastoma tumors overexpress repressor element-1 silencing transcription (REST)/neuron-restrictive silencer factor, which can be functionally countered by REST-VP16. *Mol Cancer Ther.* 2005 Mar; 4 (3): 343-9.

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

Gajjar A, Mulhern RK, Heideman RL, Sanford RA, Douglass EC, Kovnar EH, Langston JA, Jenkins JJ, Kun LE. Medulloblastoma in very young children: outcome of definitive craniospinal irradiation following incomplete response to chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1994 Jun; 12 (6):1212-6.

Garber,K. Notch Emerges as New Cancer Drug Target.*JNCI* September 5, 2007 Vol. 99, Issue 17 P23-9.

Garber K. Hedgehog drugs begin to show results.*J Natl Cancer Inst.* 2008 May 21;100(10):692-7.

García Casales Z, Echebarría Barona A, Urberuaga Pascual A, Astigarraga Aguirre I, Burgos Bretones JJ, Navajas Gutiérrez A. Differential aspects in children and adult patients with medulloblastoma. *Med Clin (Barc).* 2009 Oct 3;133 (12): 454-9.

Giangaspero F, Perilongo G, Fondelli MP, Brisigotti M, Carollo C, Burnelli R, Burger PC, Garrè ML. Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant with favorable prognosis. *J Neurosurg.* 1999 Dec; 91(6): 971-7.

Gilbertson R. J., Clifford S. C., MacMeekin W., Meekin W., Wright C., Perry R. H., Kelly P., Pearson A. D., Lunec J. Expression of the ErbB-neuregulin signaling network during human cerebellar development: implications for the biology of medulloblastoma. *Cancer Res.* , 1998.58: 3932-3941.

Gilbertson Goldowitz D., Hamre K. The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci.*, 1998;21: 375-382.

Gilbertson RJ, Ellison DW. The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol.* 2008; 3:341-65.

Giordana MT, Cavalla P, Dutto A, Borsotti L, Chiò A, Schiffer D. Is medulloblastoma the same tumor in children and adults? *J Neurooncol.* 1997 Nov; 35 (2):169-76.

Giordana MT, Duó D, Gasverde S, Trevisan E, Boghi A, Morra I, Pradotto L, Mauro A, Chió A. MDM2 overexpression is associated with short survival in adults with medulloblastoma. *Neuro Oncol.* 2002 Apr; 4(2):115-22.

Guessous F, Li Y, Abounader R. Signaling pathways in medulloblastoma. *J Cell Physiol.* 2008 Dec; 217(3): 577-8.

Gulino A, Arcella A, Giangaspero F. Pathological and molecular heterogeneity of medulloblastoma. *Curr Opin Oncol.* 2008 Nov; 20(6):668-75.

Gumireddy K, Sutton LN, Phillips PC, Reddy CD. All-trans-retinoic acid-induced apoptosis in human medulloblastoma: activation of caspase-3/poly(ADP-ribose) polymerase 1 pathway. *Clin Cancer Res.* 2003 Sep 15; 9(11): 4052-9.

Halilagic A, Ribes V, Ghyselinck NB, Zile MH, Dollé P, Studer M. Retinoids control anterior and dorsal properties in the developing forebrain. *Dev Biol.* 2007 Mar 1; 303 (1): 362-75.

Han C, Lin X. Shifted from Wnt to Hedgehog signaling pathways. *Mol Cell.* 2005 Feb 4;17(3): 321-5.

Hatton BA, Villavicencio EH, Tsuchiya KD, Pritchard JI, Ditzler S, Pullar B, Hansen S, Knoblauch SE, Lee D, Eberhart CG, Hallahan AR, Olson JM. The Smo/Smo model: hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread. *Cancer Res.* 2008 Mar 15; 68(6):1768-76.

Herms J, Neidt I, Lüscher B, Sommer A, Schürmann P, Schröder T, Bergmann M, Wilken B, Probst-Cousin S, Hernáiz-Driever P, Behnke J, Hanefeld F, Pietsch T, Kretzschmar HA. C-MYC expression in medulloblastoma and its prognostic value. *Int J Cancer.* 2000 Sep 20;89(5):395-402.

Hernan R, Fasheh R, Calabrese C, Frank AJ, Maclean KH, Allard D, Barraclough R, Gilbertson RJ. ERBB2 up-regulates S100A4 and several other prometastatic genes in medulloblastoma. *Cancer Res.* 2003 Jan 1;63(1):140-8.

Hever AM, Williamson KA, van Heyningen V. Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2. *Clin Genet.* 2006 Jun;69(6):459-70.

Hinman VF, Degnan BM. Retinoic acid perturbs Otx gene expression in the ascidian pharynx. *Dev Genes Evol.* 2000 Mar; 210 (3):129-39.

Ho DM, Hsu CY, Chiang H. Histopathologic grading of medulloblastomas. *Cancer.* 2002 Dec 15; 95 (12):2577-8; author reply 2578-9.

Huang H., Mahler-Araujo B. M., Sankila A., Chimelli L., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am. J. Pathol.*, 2000. 156: 433-437.

Joksimovic M, Yun BA, Kittappa R, Anderegg AM, Chang WW, Taketo MM, McKay RD, Awatramani RB. Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat Neurosci.* 2009 Feb;12 (2):125-31.

Kalderon D. Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol.*, 2002; 12: 523-531.

Kastury K, Druck T, Huebner K, Barletta C, Acampora D, Simeone A, Faiella A, Boncinelli E. Chromosome locations of human EMX and OTX genes. *Genomics.* 1994 Jul 1; 22(1): 41-5.

Katoh M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. *Stem Cell Rev.* 2007 Jan; 3(1): 30-8.

Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med.* 2009 Sep; 9(7): 873-86.

Katsetos CD, Herman MM, Frankfurter A, et al. Cerebellar desmoplastic medulloblastomas. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113:1019–1029.

Kimura J, Suda Y, Kurokawa D, Hossain ZM, Nakamura M, Takahashi M, Hara A, Aizawa S. Emx2 and Pax6 function in cooperation with Otx2 and Otx1 to develop caudal forebrain primordium that includes future archipallium. *J Neurosci.* 2005 May 25; 25 (21): 5097-108.

Koch A., Waha A., Tonn J. C., Sorensen N., Berthold F., Wolter M., Reifenberger J., Hartmann W., Friedl W., Reifenberger G., Wiestler O. D., Pietsch T. Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors. *Int. J. Cancer*, 93: 445-449, 2001.

Koci TM, Chiang F, Mehringer CM, Yuh WT, Mayr NA, Itabashi H, Pribram HF. Adult cerebellar medulloblastoma: imaging features with emphasis on MR findings. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1993 Jul-Aug; 14(4):929-39.

Kool,M; Koster, J; Bunt ,J; Hasselt,N; Lakeman,A; SluisP, Troost,D; Schouten-van Meeteren, N , Huib N. Caron; Cloos,J; Mrs'ic'5,A; Ylstra,B; Grajkowska,W Hartmann, W; Pietsch,T;Ellison,D; CliffordD; Versteeg,R. Integrated Genomics Identifies Five Medulloblastoma Subtypes with Distinct Genetic Profiles, Pathway Signatures and Clinicopathological Features. 14 August 2008 Vol 3 e3088.

Kunschner LJ, Kuttesch J, Hess K, Yung WK. Survival and recurrence factors in adult medulloblastoma: the M.D. Anderson Cancer Center experience from 1978 to 1998. *Neuro Oncol.* 2001 Jul; 3(3): 167-73.

Ishida, Valter Kenji. Estatuto da Criança e do Adolescente - Doutrina e Jurisprudência - 11ª ed. 2010. Editora Atlas .São Paulo,2010 .p08.

Lafay-Cousin L, Strother D. Current treatment approaches for infants with malignant central nervous system tumors. *Oncologist.* 2009 Apr;14(4):433-44.

Latimer, F. R., AlSaadi, A. A., and Robbins, T. O.: Cytogenetic studies of human brain tumors and their clinical significance: 1. Medulloblastoma. *J. Neurooncol.* , 1987. 4:287-91.

Lawinger P, Venugopal R, Guo ZS, Immaneni A, Sengupta D, Lu W, Rastelli L, Marin Dias Carneiro A, Levin V, Fuller GN, Echelard Y, Majumder S. The neuronal repressor REST/NRSF is an essential regulator in medulloblastoma cells. *Nat Med.* 2000 Jul; 6(7): 826-31. Erratum in: *Nat Med* 2000 Sep; 6(9): 1062.



Lee Y., McKinnon P. J. DNA ligase IV suppresses medulloblastoma formation by cMYC. *Cancer Res.* , 2002. 62: 6395-6399.

Liu J, Guo L, Jun-Wei L, Liu N, Li H. All-trans retinoic acid modulates fas expression and enhances chemosensitivity of human medulloblastoma cells. *Int J Mol Med.* 2000 Feb; 5(2):145-9.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method. *Methods.* 2001 Dec; 25(4): 402-8.

Luttjeboer M, Kaspers GJ. Medulloblastoma: need for targeted treatment. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006 May; 6(5): 649-52.

MacDonald T. J., Brown K. M., LaFleur B., Peterson K., Lawlor C., Chen Y., Packer R. J., Cogen P., Stephan D. A. Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. *Nat. Genet.* , 2001. 29: 143-152.

Malheiros SM, Franco CM, Stávale JN, Santos AJ, Borges LR, Pelaez MP, Ferraz FA, Gabbai AA. Medulloblastoma in adults: a series from Brazil. *J Neurooncol.* 2002 Dec; 60(3): 247-53.

Malheiros SM, Carrete H Jr, Stávale JN, Santos AJ, Borges LR, Guimarães IF, Pelaez MP, Franco CM, Gabbai AA. MRI of medulloblastoma in adults. *Neuroradiology.* 2003 Jul; 45(7):463-7.

Marino S. Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med.* 2005 Jan;11(1):17-22.

Mao J, Ligon KL, Rakhlin EY, Thayer SP, Bronson RT, Rowitch D, McMahon AP. A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer Res.* 2006 Oct 15; 66(20): 10171-8.

Michiels EM, Oussoren E, Van Groenigen M, Pauws E, Bossuyt PM, Voûte PA, Baas F. Genes differentially expressed in medulloblastoma and fetal brain. *Physiol Genomics*. 1999 Aug 31; 1(2):83-91.

Min HS, Lee YJ, Park K, Cho BK, Park SH. Medulloblastoma: histopathologic and molecular markers of anaplasia and biologic behavior. *Acta Neuropathol*. 2006 Jul;112(1):13-20.

Miralbell R, Fitzgerald TJ, Laurie F, Kessel S, Glicksman A, Friedman HS, Urie M, Kepner JL, Zhou T, Chen Z, Barnes P, Kun L, Tarbell NJ. Radiotherapy in pediatric medulloblastoma: quality assessment of Pediatric Oncology Group Trial 9031. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Apr 1; 64(5):1325-30.

Moon R. T., Bowerman B., Boutros M., Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through  $\beta$ -catenin. *Science (Wash. DC)*, 296: 1644-1646, 2002.

Nomura Y, Yasumoto S, Yanai F, Akiyoshi H, Inoue T, Nibu K, Tsugu H, Fukushima T, Hirose S. Survival and late effects on development of patients with infantile brain tumor. *Pediatr Int*. 2009 Jun; 51(3):337-41.

Nusse R. Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development*. 2003 Nov; 130(22): 5297-305.

Pantò MR, Zappalà A, Tuorto F, Cicirata F. Role of the Otx1 gene in cell differentiation of mammalian cortex. *Eur J Neurosci*. 2004 May; 19 (10): 2893-902.

Pietsch T, Koch A, Wiestler OD. Molecular genetic studies in medulloblastomas: evidence for tumor suppressor genes at the chromosomal regions 1q31-32 and 17p13. *KlinPadiatr*. 1997 Jul-Aug; 209 (4):150-5.

Pozniak CD, Pleasure SJ. A tale of two signals: Wnt and Hedgehog in dentate neurogenesis. *Sci STKE*. 2006 Jan 24; 2006 (319-23).

Raffel C., Jenkins R. B., Frederick L., Hebrink D., Alderete B., Fults D. W., James C. D. Sporadic medulloblastomas contain *PTCH* mutations. *Cancer Res.* , 1997, 57: 842-845.

Raffel C. Medulloblastoma: molecular genetics and animal models. *Neoplasia*. 2004 Jul-Aug; 6(4):310-22.

Ray A, Ho M, Ma J, Parkes RK, Mainprize TG, Ueda S, McLaughlin J, Bouffet E, Rutka JT, Hawkins CE. A clinicobiological model predicting survival in medulloblastoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Nov 15;10(22):7613-20.

Roop D, Toftgård R. Hedgehog in Wnterland. *Nat Genet*. 2008 Sep;40(9):1040-1.

Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A. Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res*. 2008 Feb 15; 14(4): 971-6.

Rutkowski S, Cohen B, Finlay J, Luksch R, Ridola V, Valteau-Couanet D, Hara J, Garre ML, Grill J. Medulloblastoma in young children. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Apr; 54(4): 635-7.

Salsano E, Pollo B, Eoli M, Giordana MT, Finocchiaro G. Expression of MATH1, a marker of cerebellar granule cell progenitors, identifies different medulloblastoma sub-types. *Neurosci Lett*. 2004 Nov 11;370(2-3):180-5

Sardi I, Giunti L, Donati P, Lacitignola L, Tucci F, Sardo L, Giovannucci Uzielli ML, Bernini G. Loss of heterozygosity and p53 polymorphism

Pro72Arg in a young patient with medulloblastoma. *Oncol Rep.* 2003 May-Jun;10(3):773-5.

Sarkar C, Pramanik P, Karak AK, Mukhopadhyay P, Sharma MC, Singh VP, Mehta VS. Are childhood and adult medulloblastomas different? A comparative study of clinicopathological features, proliferation index and apoptotic index. *J Neurooncol.* 2002 Aug; 59(1):49-61

Saylor RL 3rd, Sidransky D, Friedman HS, Bigner SH, Bigner DD, Vogelstein B, Brodeur GM. Infrequent p53 gene mutations in medulloblastomas. *Cancer Res.* 1991 Sep 1; 51(17): 4721-3.

Shahi MH, Lorente A, Castresana JS. Hedgehog signalling in medulloblastoma, glioblastoma and neuroblastoma. *Oncol Rep.* 2008 Mar; 19(3): 681-8.

Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E. Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature.* 1992 Aug 20; 358 (6388): 687-90.

Simeone A, Avantaggiato V, Moroni MC, Mavilio F, Arra C, Cotelli F, Nigro V, Acampora D. Retinoic acid induces stage-specific antero-posterior transformation of rostral central nervous system. *Mech Dev.* 1995 May; 51:83-98.

Simeone A. Otx1 and Otx2 in the development and evolution of the mammalian brain. *EMBO J.* 1998 Dec 1;17(23): 6790-8.

Simeone A, Puelles E, Acampora D. The Otx family. *Curr Opin Genet Dev.* 2002 Aug; 12(4): 409-15.

Skowrońska-Gardas A. A literature review of the recent radiotherapy clinical trials in pediatric brain tumors. *Rev Recent Clin Trials*. 2009 Jan; 4(1): 42-55.

Suda Y, Matsuo I, Kuratani S, Aizawa S. Otx1 function overlaps with Otx2 in development of mouse forebrain and midbrain. *Genes Cells*. 1996 Nov; 1(11): 1031-44.

Suda Y, Kurokawa D, Takeuchi M, Kajikawa E, Kuratani S, Amemiya C, Aizawa S. Evolution of Otx paralogue usages in early patterning of the vertebrate head. *Dev Biol*. 2009 Jan 1; 325(1): 282-95.

Sun, Li-Min 1; Yeh, Shyh-An 1; Wang, Chong-Jong 1; Huang, Eng-Yen 1; Chen, Hui-Chun 1; Hsu, Hsuan-Chih 1; Lee, Steve P. 2 Postoperative radiation therapy for medulloblastoma - high recurrence rate in the subfrontal region. *Journal of Neuro-Oncology*. 2002; 58 (1):77-85.

Suresh TN, Santosh V, Yasha TC, Anandh B, Mohanty A, Indiradevi B, Sampath S, Shankar SK. Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant occurring in the very young-clinicopathological and immunohistochemical study of four cases. *Childs Nerv Syst*. 2004 Jan; 20(1): 55-60.

Szymas J, Biczysko W, Gabryel P, Morkowski S. Medulloblastoma: histological evaluation and prognosis. A clinical, immunohistochemical and electron microscopic study. *Childs Nerv Syst*. 1987; 3(2): 74-80.

Taylor M. D., Liu L., Raffel C., Hui C. C., Mainprize T. G., Zhang X., Agatep R., Chiappa S., Gao L., Lowrance A., et al Mutations in *SUFU* predispose to medulloblastoma. *Nat. Genet.* , 2002. 31: 306-310.

Taylor, Michael D 1,2; Zhang, Xiaoyun 3; Liu, Ling 4; Hui, Chi-Chung 3; Mainprize, Todd G 1,2; Scherer, Stephen W 3; Wainwright, Brandon 7; Hogg, David 4,5,6; Rutka, James T \*,1,2 Failure of a medulloblastoma-derived mutant of *SUFU* to suppress WNT signaling. *Oncogene*. June 3, 2004.23(26): 4577-4583.

Thomas PR, Duffner PK, Cohen ME, Sinks LF, Tebbi C, Freeman AI. Multimodality therapy for medulloblastoma. *Cancer*. 1980 Feb 15; 45(4): 666-9.

Tian E, Kimura C, Takeda N, Aizawa S, Matsuo I. Otx2 is required to respond to signals from anterior neural ridge for forebrain specification. *Dev Biol*. 2002 Feb 15; 242 (2): 204-23.

Toftgård R. Hedgehog signalling in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Nov; 57(12): 1720-31.

Vernay B, Koch M, Vaccarino F, Briscoe J, Simeone A, Kageyama R, Ang SL. Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *J Neurosci*. 2005 May 11; 25(19): 4856-67.

Vorechovský I, Tingby O, Hartman M, Strömberg B, Nister M, Collins VP, Toftgård R. Somatic mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in primitive neuroectodermal tumours. *Oncogene*. 1997 Jul 17; 15(3):361-6.

Wada S, Hamada M, Kobayashi K, Satoh N. Novel genes involved in canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway in early *Ciona intestinalis* embryos. *Dev Growth Differ*. 2008 May; 50(4): 215-27.

Ward E, Hopkins M, Arbuckle L, Williams N, Forsythe L, Bujkiewicz S, Pizer B, Estlin E, Picton S. Nutritional problems in children treated for medulloblastoma: Implications for enteral nutrition support. *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Jun 15. 2009 Oct; 53 (4):570-5.

Watterson J, Simonton SC, Rorke LB, Packer RJ, Kim TH, Spiegel RH, Priest JR. Fatal brain stem necrosis after standard posterior fossa radiation

and aggressive chemotherapy for metastatic medulloblastoma. *Cancer*. 1993 Jun 15; 71(12): 4111-7.

WHO, 1995. (WHO technical Report Series, n. 854). Physical status: The use and interpretation of anthropometry.

Wong LJ, Lueth M, Li XN, Lau CC, Vogel H. Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients. *Cancer Res*. 2003 Jul 15; 63(14): 3866-71.

Yang SH, Andl T, Grachtchouk V, Wang A, Liu J, Syu LJ, Ferris J, Wang TS, Glick AB, Millar SE, Dlugosz AA. Pathological responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/beta3-catenin signaling. *Nat Genet*. 2008 Sep; 40 (9): 1130-5.

Yazigi-Rivard L, Masserot C, Lachenaud J, Diebold-Pressac I, Aprahamian A, Avran D, Doz F. Childhood medulloblastoma] . *Arch Pediatr*. 2008 Dec;15 (12): 1794-804.

Yokota N, Mainprize TG, Taylor MD, Kohata T, Loreto M, Ueda S, Dura W, Grajkowska W, Kuo JS, Rutka JT. Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene*. 2004 Apr 22; 23 (19):3444-53.

Yoon JW, Gilbertson R, Iannaccone S, Iannaccone P, Walterhouse D. Defining a role for Sonic hedgehog pathway activation in desmoplastic medulloblastoma by identifying GLI1 target genes. *Int J Cancer*. 2009 Jan 1; 124(1):109-19.

Zurawel R. H., Chiappa S. A., Allen C., Raffel C. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic  $\beta$ -catenin mutations. *Cancer Res*. , 1998. 58: 896-899.

Zurawel RH, Allen C, Chiappa S, Cato W, Biegel J, Cogen P, de Sauvage F, Raffel C. Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000 Jan; 27(1): 44-51.