Gisele Caravina de Almeida

**Análise das frequências dos subgrupos moleculares
dos meduloblastomas e associações com possíveis
fatores prognósticos**

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

Programa de Patologia

Orientador: Profº. Dr. Sérgio Rosenberg

São Paulo

2014

Gisele Caravina de Almeida

**Análise das frequências dos subgrupos moleculares
dos meduloblastomas e associações com possíveis
fatores prognósticos**

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

Programa de Patologia

Orientador: Prof^o. Dr. Sérgio Rosenberg

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Gisele Caravina de

Análise das frequências dos subgrupos moleculares dos meduloblastomas e associações com possíveis fatores prognósticos / Gisele Caravina de Almeida. -- São Paulo, 2014.

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

Orientador: Sérgio Rosemberg.

Descritores: 1.Meduloblastoma 2.Imuno-histoquímica 3.Prognóstico
4.Marcadores biológicos de tumor 5.Recidiva local de neoplasia/patologia
6.Fatores de risco

USP/FM/DBD-199/14

Agradecimentos

À Deus por Sua infinita graça e misericórdia, presenteando-me com mais esta grande conquista, abrindo-me meus olhos e meus caminhos, dando-me saúde para vencer os desafios, paciência e determinação nos momentos difíceis e amor para trilhar cada passo dessa jornada.

Ao Prof. Dr. Sérgio Rosemberg pela oportunidade que me ofereceu, pela generosidade em dividir seus conhecimentos, pela liberdade e confiança depositadas na realização dessa tese.

Ao meu marido Carlos pelo incentivo e encorajamento desde o início deste trabalho, pelo apoio e consolo ao oferecer seu ombro amigo e acolhedor nos momentos de desânimo e cansaço, pelas sugestões sutis e imprescindíveis, pela enorme tolerância com minhas ausências.

Aos meus pais Romero e Célia, meus irmãos Danielle, Michelle e Lohan e a todos os demais familiares que contribuíram para minha formação pessoal e profissional, pelo amor e dedicação durante toda a minha vida, pelo incentivo aos meus sonhos e projetos, pelas palavras corretivas e elogiosas e por suas orações.

Aos meus colegas patologistas do Hospital de Câncer de Barretos, em especial ao chefe do Departamento, Dr. Cristovam, pelo entusiasmo em cada conquista, pelas boas idéias, pela prontidão e alegria em me auxiliar sempre que precisei.

Normalização adotada

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

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

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

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

Sumário

Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Subgrupos moleculares de meduloblastomas.....	20
1.1.1 Subgrupo WNT.....	23
1.1.2 Subgrupo SHH.....	26
1.1.3 Grupo 3.....	28
1.1.4 Grupo 4.....	29
1.2 Marcadores subgrupo-específicos.....	30
1.3 Outros possíveis marcadores prognósticos.....	31
1.3.1 p53.....	32
1.3.2 Ciclina D1 e p16.....	34
1.3.3 Bcl-2.....	37
1.3.4 HER2.....	38
2 OBJETIVOS.....	41
3 MÉTODOS.....	43
3.1 Amostra.....	44
3.2 Estudo imuno-histoquímico.....	45
3.3 Estatística.....	49
3.4 Ética.....	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Descrição da casuística.....	52
4.2 Análise imuno-histoquímica.....	56
4.3 Correlação da frequência de positividade dos marcadores com dados demográficos, histológicos e clínicos.....	58
4.4 Correlação dos dados demográficos, histológicos e clínicos e da positividade para os marcadores com a sobrevida global.....	60

4.5	Correlação dos dados demográficos, histológicos e clínicos e da positividade para os marcadores com a sobrevida livre de doença.....	66
4.6	Correlação da frequência de positividade dos marcadores DKK1 / β -catenina, SFRP1, NPR3, KCNA1 entre os subgrupos de meduloblastoma.....	68
5	DISCUSSÃO.....	73
5.1	Caracterização geral da casuística e dos resultados.....	74
5.2	Caracterização dos subgrupos de meduloblastoma.....	79
6	CONCLUSÕES.....	86
7	ANEXOS.....	89
8	REFERÊNCIAS.....	94

Lista de figuras

Figura 1 - Tipos histológicos de meduloblastoma.....	17
Figura 2 - Diferenças demográficas, clínicas e genéticas entre os quatro subgrupos moleculares de meduloblastomas.....	21
Figura 3 - Novos critérios de estratificação de risco para meduloblastoma em crianças acima de três anos de idade, recentemente estabelecido no protocolo “A Clinical and Molecular Risk-Directed Therapy for Newly Diagnosed Medulloblastoma” (SJMB12).....	22
Figura 4 - Via de sinalização WNT.....	25
Figura 5 - Via de sinalização SHH.....	27
Figura 6 - Resposta mediada por p53.....	33
Figura 7 - Regulação do ciclo celular.....	36
Figura 8 - Via de sinalização de HER2.....	39
Figura 9 - Imagens de casos com marcação imuno-histoquímica positiva...	58

Lista de gráficos

Gráfico 1 - Curva de sobrevida global, de acordo com o método de Kaplan-Meier.....	55
Gráfico 2 - Curva de sobrevida livre de doença, de acordo com o método de Kaplan-Meier.....	55
Gráfico 3 - Curvas de sobrevida global segundo a faixa etária no diagnóstico.....	60
Gráfico 4 - Curvas de sobrevida global segundo o gênero.....	61
Gráfico 5 - Curvas de sobrevida global segundo metástase no Diagnóstico.....	62
Gráfico 6 - Curvas de sobrevida global segundo grupos de risco.....	63
Gráfico 7 - Proporção entre os subgrupos de meduloblastoma segundo a positividade exclusiva para os marcadores DKK1 / β -catenina (subgrupo WNT), SFRP1 (subgrupo SHH), NPR3 (Grupo 3), KCNA1 (Grupo 4).....	68
Gráfico 8 - Análise da sobrevida global para os 4 subgrupos de meduloblastoma.....	70
Gráfico 9 - Análise da sobrevida livre de doença para os 4 subgrupos de meduloblastoma.....	71

Lista de tabelas

Tabela 1 - Marcadores imuno-histoquímicos utilizados para identificar os subgrupos de meduloblastoma.....	31
Tabela 2 - Descrição dos métodos e anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica.....	46
Tabela 3 - Descrição dos anticorpos com os respectivos padrões de marcação para análise imuno-histoquímica e os controles positivos que acompanharam as reações.....	47
Tabela 4 - Dados quantitativos das variáveis demográficas, histológicas e clínicas.....	53
Tabela 5 - Correlação da faixa etária com diferentes variáveis.....	54
Tabela 6 - Resultados do estudo imuno-histoquímico para todos os anticorpos analisados.....	56
Tabela 7 - Descrição da positividade exclusiva para os marcadores representativos dos subgrupos de meduloblastoma.....	57
Tabela 8 - Análise da marcação imuno-histoquímica positiva de acordo com as diferentes variáveis.....	59
Tabela 9 - Análise de sobrevida global entre variáveis demográficas, histológicas e clínicas.....	64
Tabela 10 - Análise de sobrevida global entre os marcadores p53, ciclinaD1, p16 e bcl2.....	65
Tabela 11 - Análise de sobrevida global entre os marcadores representativos dos subgrupos de meduloblastoma com positividade exclusiva.....	65
Tabela 12 - Análise de sobrevida livre de doença entre variáveis demográficas, histológicas e clínicas.....	66
Tabela 13 - Análise de sobrevida global entre os marcadores p53, ciclinaD1, p16 e bcl2.....	67

Tabela 14 - Análise de sobrevida livre de doença entre os marcadores representativos dos subgrupos de meduloblastoma com positividade exclusiva.....	67
Tabela 15 - Correlação das frequências dos 4 subgrupos entre os dados demográficos, histológicos e de metástase ao diagnóstico (N (N%)) e análises de sobrevida global e livre de doença.....	69
Tabela 16 - Frequência de positividade para os marcadores p53, ciclinaD1, p16 e bcl2 em cada um dos 4 subgrupos de meduloblastoma.....	72
Tabela 17 - Análise comparativa entre os resultados do presente estudo e os descritos na literatura para cada subgrupo de meduloblastoma.....	83

Resumo

Almeida GC. *Análise das frequências dos subgrupos moleculares dos meduloblastomas e associações com possíveis fatores prognósticos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: Meduloblastoma é o tumor cerebral embrionário maligno mais comum da infância. O esquema de tratamento atual inclui ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Embora a taxa de sobrevida global tenha aumentado nos últimos anos, em decorrência do tratamento os sobreviventes frequentemente sofrem com sequelas de ordem neurológica, endocrinológica e social. O esquema de classificação de risco atual não considera a heterogeneidade existente entre os pacientes e entre os tumores. No entanto, estudos recentes reconheceram quatro subgrupos moleculares distintos de meduloblastomas (WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4), que confirmam essa heterogeneidade e formam, em conjunto, o melhor fator definidor de prognóstico para essa neoplasia. Esses subgrupos poderiam ser identificados através de marcadores imuno-histoquímicos representativos para cada um deles. O presente estudo teve como objetivo definir a frequência dos subgrupos de meduloblastomas na população brasileira através da positividade imuno-histoquímica para esses marcadores e analisar a frequência de positividade de outros marcadores também descritos como tendo importância prognóstica.

MÉTODOS: 61 casos de meduloblastoma foram submetidos a estudo imuno-histoquímico para 5 marcadores descritos como tendo importância prognóstica (p53, ciclinaD1, p16, bcl2 e HER2) e para 5 marcadores descritos como representativos dos subgrupos moleculares de meduloblastoma (DKK1 e β -catenina (subgrupo WNT), SFRP1 (subgrupo SHH), NPR3 (Grupo 3) e KCNA1 (Grupo 4). Os resultados foram correlacionados com os dados demográficos, histológicos e clínicos.

RESULTADOS: Nenhum dos 10 marcadores imuno-histoquímicos revelou-se fator prognóstico em meduloblastoma. Os 5 marcadores representativos dos subgrupos moleculares apresentaram

positividade para mais de 1 marcador ou negatividade para todos os marcadores na maioria dos casos. Apesar disso, foi possível classificar 22 casos nos quatro subgrupos de meduloblastomas por meio da positividade exclusiva para esses marcadores. Os resultados das análises entre os subgrupos e as respectivas frequências quanto às variáveis demográficas, histológicas, clínicas e prognósticas foram semelhantes aos descritos na literatura. CONCLUSÕES: Os marcadores imuno-histoquímicos analisados não apresentaram valor prognóstico nesta casuística, e os marcadores descritos como representativos dos quatro subgrupos moleculares mostraram-se pouco sensíveis e específicos para classificar os meduloblastomas.

Descritores: Meduloblastoma, Imuno-histoquímica, Prognóstico, Marcadores biológicos de tumor, Recidiva local de neoplasia/patologia, Fatores de risco.

Abstract

Almeida GC. *Analysis of the frequencies of molecular subgroups of medulloblastomas and associations with possible prognostic factors*. [thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paul; 2014.

INTRODUCTION: Medulloblastoma, a malignant embryonal brain tumor, is the most frequently occurring brain tumor in children. Treatment strategy involves surgery, radiotherapy and chemotherapy. Overall survival rate has increased in recent years, but survivors often present neurological sequelae, as well as endocrine and social disorders, as a result of the treatment. Medulloblastoma is no longer consider a single disease: standard risk stratification disregards heterogeneity related to both patients and tumors, and recent work has generated a molecular stratification of the medulloblastomas into 4 distinct subgroups (WNT, SHH, Group 3 and Group 4), currently considered the best prognostic factor. Representative immunohistochemical markers could help identify each one of those subgroups. Our study aimed to establish the frequency of subgroups of medulloblastomas, in brazilian population, by immunohistochemical positivity for its specific markers, and also analyze the frequency of positivity for other markers that are equally implicated in prognosis.

METHODS: We evaluated immunohistochemistry expression of 5 markers – DKK1 and β -catenin (subgroup WNT), SFRP1 (subgroup SHH), NPR3 (Group 3) and KCNA1 (Group 4) – to determine molecular subgroup affiliation of 61 cases of medulloblastomas, along with 5 other markers widely used in daily practice that may have prognostic value in medulloblastomas (p53, cyclinD1, p16, bcl2 and HER2). Results were correlated to demographic, histological and clinical data.

RESULTS: None of the 10 immunohistochemical markers investigated proved to be significant prognostic factor in our series. Five representative immunohistochemical markers of the molecular subgroups exhibited positivity for more than one marker or negativity for all markers in most cases. Nevertheless, we manage to determine molecular affiliation in one of the 4 subgroups in 22 cases, due to their exclusive positivity related to the

representative markers. Regarding frequencies of occurrence, demographics, histological characteristics, clinical aspects and prognosis, our results related to the 22 cases were similar to those reported in the literature. CONCLUSIONS: Immunohistochemical markers considered representative for each of the 4 molecular subgroups were poorly sensitive and specific, and others markers evaluated did not reveal prognostic value in our series.

Descriptors: Medulloblastoma, Immunohistochemistry, Prognostic, Biological markers of tumor, Local recurrence of cancer / pathology, Risk factors.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Meduloblastoma é um tumor embrionário maligno do cerebelo, cuja incidência ocorre preferencialmente em crianças, com pico etário aos 7 anos. A maioria dos casos (cerca de 70%) ocorre antes dos 16 anos de idade e, entre os adultos, 80% ocorrem entre 21 e 40 anos de idade (Giangaspero et al., 2007).

A neoplasia é um pouco mais frequente no sexo masculino (aproximadamente 1,5: 1) (Giangaspero et al., 2007).

Meduloblastomas são classificados histologicamente em cinco tipos: clássico, desmoplásico / nodular, com extensa nodularidade, anaplásico e de grandes células (Giangaspero et al., 2007).

Os meduloblastomas clássicos são neoplasias densamente celulares, constituídas por células pequenas e redondas / ovas com alta relação núcleo / citoplasma; são os mais frequentes e correspondem a 70-80% de todos os meduloblastomas (Entz-Werle et al., 2008; Ellison et al., 2010). Meduloblastomas desmoplásicos / nodulares e com extensa nodularidade são comuns em lactentes e crianças mais novas e podem apresentar maior sobrevida global quando comparados ao tipo clássico (Ellison et al., 2010). São frequentemente agrupados e chamados de tumores desmoplásicos devido à similaridade histológica (ambos produzem reticulina) e prognóstica (Rutkowski, von Bueren et al., 2007; Ellison et al., 2010); apresentam frequência de cerca de 20%. (Entz-Werle et al., 2008). Ambos são formados por nódulos de células neurocíticas diferenciadas, separados por áreas internodulares indiferenciadas. Os subtipos anaplásicos e de grandes células correspondem a cerca de 5%

dos meduloblastomas (Giangaspero et al., 2007). Também apresentam similaridades histológicas que permitem seu agrupamento, sendo conhecidos como meduloblastomas anaplásicos / de grandes células (A/GC) e estão associados ao pior prognóstico (Kim et al., 2011).

Os anaplásicos exibem pleomorfismo nuclear e citoplasmático, enquanto os de grandes células são constituídos por células redondas monomórficas, com nucléolos evidentes. Ambos exibem alto índice mitótico, apoptose e figuras de canibalismo celular (Figura 1).

Figura 1 - Tipos histológicos de meduloblastoma. A - Clássico (400X); B - Desmoplásico / nodular (100X); C - com extensa nodularidade (100X); D – Anaplásico / grandes células (A/GC) (1000X)

O Meduloblastoma é curável em aproximadamente 70% dos casos (Gottardo et al., 2014). O esquema de tratamento atual inclui ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Embora a taxa de sobrevida global tenha aumentado nos últimos anos, os sobreviventes frequentemente sofrem com importantes sequelas terapêuticas de ordem neurológica, endocrinológica e social (Northcott et al., 2011).

Pacientes com 3 anos de idade ou mais, com tumores totalmente ressecados (resíduo tumoral após a cirurgia menor que $1,5\text{cm}^2$) e sem disseminação leptomeningea ou doença metastática ao diagnóstico são classificados como “risco padrão”. Todos os outros pacientes que não se enquadram nesses critérios são classificados como “alto risco” (Giangaspero et al., 2007).

Tal esquema de classificação de risco não considera a grande heterogeneidade existente entre os pacientes e entre a biologia dos tumores, havendo casos em que há tratamento excessivo, resultando em maior morbidade, e casos que mereceriam maior agressividade terapêutica (Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011).

O conhecimento mais amplo da biologia do meduloblastoma e sua interação com cada doente individualmente é de grande importância, pois possibilitaria o surgimento de novas modalidades terapêuticas personalizadas, que objetivassem alvos moleculares e visassem ao aumento da sobrevida e concomitante redução das morbidades e sequelas relacionadas ao tratamento. Nos últimos cinco anos, esse conhecimento tem aumentado enormemente e hoje existe consenso estabelecido de que o meduloblastoma não é neoplasia única, mas um conjunto de subgrupos moleculares distintos com prognósticos

diferentes. Tais descobertas são clinicamente relevantes e diversos alvos moleculares terapêuticos já estão em fase de teste.

A classificação molecular hoje é realizada utilizando-se técnicas que avaliam o perfil de expressão gênica, perfil de metilação gênica e variação do número de cópias cromossômicas, as quais necessitam de modernas técnicas de bioinformática para interpretação dos resultados. Portanto, essa classificação, até o momento, é cara, trabalhosa, exige mão-de-obra especializada e equipamentos de altíssimo custo, o que inviabiliza sua realização na prática clínica pela maioria dos laboratórios. (Northcott et al., 2012). Portanto, justifica-se a pesquisa de marcadores confiáveis, capazes de definir os subgrupos estabelecidos de forma rápida, prática e econômica, para o benefício dos pacientes com meduloblastoma.

O método imuno-histoquímico é a técnica amplamente difundida e utilizada na prática diária de todos os laboratórios de patologia. Sempre que ocorrem descobertas moleculares sobre qualquer doença, especificamente sobre neoplasias, há a tentativa de validar esses achados através da avaliação da expressão proteica por imuno-histoquímica. Quando há sucesso nessa validação, mais facilmente acontece a difusão do método para ser aplicado na prática diagnóstica mundial. Por isso, muitos estudos têm pesquisado possíveis marcadores imuno-histoquímicos e suas capacidades para separar os subgrupos. Alguns desses estudos e desses marcadores serão descritos em seguida.

1.1 Subgrupos moleculares de meduloblastomas

Estudos genômicos recentes identificaram a existência de múltiplos subgrupos moleculares de meduloblastomas (Kool et al., 2008; Northcott, et al., 2011; Remke et al., 2011). Alguns estudos subdividiram os meduloblastomas em cinco (Kool et al., 2008) ou até em seis grupos distintos (Thompson et al., 2006).

Um importante estudo comparou o perfil de expressão gênica e as alterações no número de cópias do DNA de 103 meduloblastomas primários com análise imuno-histoquímica de 294 outros meduloblastomas. Após análise do perfil transcricional, foram identificados 4 subgrupos moleculares distintos: WNT (Wingless), SHH (Sonic Hedgehog), grupo C e grupo D (Northcott et al., 2011).

Segundo os autores, os tumores podem ser classificados dentro desses subgrupos por meio de quatro marcadores imuno-histoquímicos de forma confiável (98% de confiabilidade), os quais são praticamente específicos para cada uma das variantes moleculares, da seguinte maneira: DKK1 seria marcador do subgrupo WNT, SFRP1 do subgrupo SHH, NPR3 do grupo C e KCNA1 do grupo D. Esse estudo causou grande impacto na comunidade científica por descrever quatro marcadores subgrupos-específicos com tamanha confiabilidade. Consequentemente, diversos outros estudos começaram a surgir com o objetivo de reproduzir os mesmos resultados.

O consenso atual confirma a existência de quatro subgrupos de meduloblastomas e recomenda que sejam denominados da seguinte forma: WNT, SHH, Grupo 3 (ao invés de grupo C) e Grupo 4 (ao invés de grupo D)

(Taylor et al., 2012). Os subgrupos WNT e SHH são assim denominados devido às respectivas vias de sinalização, as quais têm importância fundamental em sua patogênese. A biologia dos subgrupos 3 e 4 ainda é pouco conhecida e por isso o consenso preferiu manter nomes genéricos até que haja maior compreensão sobre eles (Taylor et al., 2012). Recentemente, uma metanálise internacional, associando dados de sete estudos independentes, mostrou que o Grupo 4 constitui 34% dos meduloblastomas, seguido por SHH (28%), Grupo 3 (27%) e WNT (11%), (Kool et al., 2012). Os subgrupos descritos são distintos nos aspectos demográficos, nas apresentações clínica e histológica, no perfil transcricional, nas anormalidades genéticas e quanto ao prognóstico clínico (Northcott et al. 2011; Taylor et al., 2012). (Figura 2).

Molecular Subgroups of Medulloblastoma				
CONSENSUS	WNT	SHH	Group 3	Group 4
Cho (2010)	C6	C3	C1/C5	C2/C4
Northcott (2010)	WNT	SHH	Group C	Group D
Kool (2008)	A	B	E	C/D
Thompson (2006)	B	C', D	E, A	A, C
DEMOGRAPHICS				
Age Group:
Gender: ♀ ♂	♂ ♂ : ♀ ♀	♂ ♂ : ♀ ♀	♂ ♂ : ♀	♂ ♂ : ♀
CLINICAL FEATURES				
Histology	classic, rarely LCA	desmoplastic/nodular, classic, LCA	classic, LCA	classic, LCA
Metastasis	rarely M+	uncommonly M+	very frequently M+	frequently M+
Prognosis	very good	infants good, others intermediate	poor	intermediate
GENETICS
CTNNB1 mutation	PTCH1/SMO/SUFU mutation GLI2 amplification MYCN amplification	i17q MYC amplification	i17q CDK6 amplification MYCN amplification
GENE EXPRESSION
WNT signaling MYC +	SHH signaling MYCN +	Photoreceptor/GABAergic MYC +++	Neuronal/Glutamatergic minimal MYC / MYCN

Figura 2: Diferenças demográficas, clínicas e genéticas entre os quatro subgrupos moleculares de meduloblastomas (Taylor et al., 2012).

Baseado nessas diferenças foi desenvolvido pelo St. Jude Children's Research Hospital o protocolo (SJMB03) de estratificação de risco para tratamento do meduloblastoma em crianças acima de 3 anos de idade (Gottardo et al., 2014), que tem sido utilizado como modelo para outro estudo do St. Jude Children's Hospital, atualmente em fase II, cuja finalidade é estratificar a terapêutica dos meduloblastomas conforme o risco clínico e o subgrupo molecular, "A Clinical and Molecular Risk-Directed Therapy for Newly Diagnosed Medulloblastoma" (SJMB12) (Figura 3).

Figura 3. Novos critérios de estratificação de risco para meduloblastoma em crianças acima de 3 anos de idade, recentemente estabelecido no protocolo "A Clinical and Molecular Risk-Directed Therapy for Newly Diagnosed Medulloblastoma" (SJMB12). M0: ausência de metástase ao diagnóstico; M+: presença de metástase ao diagnóstico; GTR/NTR: ressecção cirúrgica total ou quase total; LC/A: tipo histológico anaplásico / grandes células (Gottardo et al., 2014)

Existe ampla concordância na comunidade científica de que a estratificação dos meduloblastomas em quatro subgrupos moleculares distintos deveria ser incluída na próxima edição das diretrizes da Organização Mundial da Saúde. Um quinto subgrupo, designado como “sem outras especificações”, poderá ser incluído para tumores raros com fenótipo melanótico (meduloblastoma melanocítico) ou rabdomioblástico (medulomioblastoma) por não se encaixarem dentro dos quatro subgrupos originais e pela dificuldade em classificá-los devido à limitação de amostragem (Gottardo et al., 2014).

1.1.1 Subgrupo WNT

Subgrupo WNT é o mais conhecido devido ao melhor prognóstico em relação aos demais subgrupos e à melhor taxa de sobrevida em longo prazo (provavelmente acima de 90%). Os óbitos devem-se normalmente às complicações do tratamento, incluindo neoplasias secundárias à radioterapia (Taylor et al., 2012).

Quase todos os meduloblastomas WNT são de histologia clássica, e mesmo alguns raros tumores A/GC mantêm um bom prognóstico (Taylor et al., 2012). Epidemiologicamente, o subgrupo WNT apresenta proporção homem/mulher de 1:1, o que o diferencia dos meduloblastomas em geral, dado que estes são mais comuns no sexo masculino (Kool et al., 2012). Apesar de poder ocorrer em qualquer faixa etária, é incomum em crianças menores de 3 anos (Kool et al., 2012; Taylor et al., 2012).

Mutações germinativas da proteína inibidora APC (*Adenomatous polyposis coli*) da via WNT predis põem à síndrome de Turcot, que apresenta

dentre suas características, propensão para desenvolvimento de meduloblastoma. Já mutações somáticas do gene *CTNNB1*, que codifica a proteína β -catenina, são encontradas nos meduloblastomas esporádicos (Taylor et al., 2012). Além disso, meduloblastomas WNT são descritos como tendo monossomia do cromossomo 6, altos níveis de expressão do gene *MYC*, positividade imuno-histoquímica no núcleo da célula tumoral para a proteína β -catenina e positividade para o marcador imuno-histoquímico DKK1 (Taylor et al., 2012).

O componente essencial da via de sinalização WNT é a proteína β -catenina. A sequência de eventos ocorre da seguinte forma: a ligação de WNT ao seu receptor Frizzled desestabiliza uma multiproteína complexa formada por GSK3 β , AXIN e APC, liberando a entrada da proteína β -catenina no núcleo e subsequente ativação do fator de transcrição TCF/LEF – o qual induz a expressão de genes pró-proliferativos, incluindo *ciclina D1* e *Myc* (Polkinghorn e Tarbell, 2007; Raabe e Eberhart, 2013). (Figura 4).

Figura 4 - Via de sinalização WNT. A ativação da via WNT requer a associação de Frizzled (Fz) com seu co-receptor Lrp5/6. A formação do complexo Wnt/Fz/Lrp5/6 ativa a fosforilação de Dvl, um componente integral do receptor Fz que recruta Axin/Gsk3, dissociando o complexo Axin/APC/Gsk3. Lrp5/6 é sequencialmente fosforilado e se liga a Axin/Gsk3, formando um complexo que estabiliza β -catenina. Isso inibe sua degradação proteolítica, permitindo o acúmulo citoplasmático de β -catenina e sua translocação para o núcleo celular, onde se liga a TCF/LEF e promove a ativação da expressão de genes pró-proliferativos, incluindo *ciclina D1* e *Myc* (Caliguri, 2008)

Portanto, a ativação da via WNT é reconhecida pelo acúmulo nuclear de β -catenina (Ellison et al., 2005; Thompson et al., 2006; Korshunov et al., 2010) e esse acúmulo pode ser avaliado através de estudo imuno-histoquímico positivo para β -catenina no núcleo da célula tumoral.

Um estudo avaliou a expressão proteica de β -catenina, a mutação do gene *CTNNB1* e a hibridização genômica comparativa em 72 meduloblastomas pediátricos e encontraram marcação nuclear extensa (mais de 50% das células tumorais marcadas) em 6 casos e marcação nuclear focal (menos de 10% das células marcadas) em 3 casos. Casos extensivamente marcados para β -catenina nuclear apresentaram: mutação do gene *CTNNB1*, forte ativação da via WNT / β -catenina documentada pelo perfil de expressão e prognóstico significativamente melhor. Todos os outros casos que tiveram marcação focal

nuclear para β -catenina, marcação citoplasmática ou que foram negativos não apresentaram mutação de *CTNNB1* ou ativação da via WNT / β -catenina (Fattet et al., 2009).

Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo que demonstrou positividade nuclear para β -catenina em 25% de 109 meduloblastomas pediátricos analisados, cujo prognóstico foi significativamente melhor do que o dos pacientes com tumores que apresentaram positividade citoplasmática para β -catenina ou que foram negativos. A mutação de *CTNNB1* também ocorreu exclusivamente nos casos de positividade nuclear para β -catenina (Ellison et al., 2005). No entanto, esse estudo não revelou qual índice de positividade nuclear foi utilizado para que a neoplasia fosse considerada positiva para β -catenina.

1.1.2 Subgrupo SHH

Mutações na via de sinalização SHH são responsáveis pela tumorigênese desse subgrupo na grande maioria dos casos. Indivíduos com mutações germinativas no gene *PATCHED* (gene supressor de tumor), que codificada a proteína receptora de membrana PTCH (ou PTC) da via SHH, têm síndrome de Gorlin, a qual predispõe ao surgimento do meduloblastoma (Taylor et al., 2000). Se a mutação germinativa ocorrer em *SUFU* (regulador negativo para via SHH), haverá uma predisposição para o surgimento de meduloblastoma na infância. Mutações somáticas de PTCH, SMO (ou *smoothed*: proteína receptora de membrana codificada pelo gene *SMO*) e *SUFU* ou amplificações de *GLI* (fator de transcrição codificado por oncogene

associado ao glioma humano), são encontradas nos meduloblastomas esporádicos. Deleção do cromossomo 9p parece estar limitada ao subgrupo SHH, o qual também apresenta altos níveis de expressão de *NMYC* (Taylor et al., 2012). A via de sinalização SHH está esquematizada na figura 5.

Figura 5 - Via de sinalização SHH. Na ausência do ligante Sonic Hedgehog (Shh), o regulador negativo (receptor de membrana) denominado patched (PTC) bloqueia a sinalização celular através de smoothed (SMO). Quanto Shh liga-se a PTC, essa ligação inibe a função de PTC e libera smoothed (SMO) para ativar eventos intracelulares, incluindo a expressão de fatores de transcrição pró-proliferativos incluindo *MycN* e *GLI* no núcleo. No entanto, a via Shh pode ser regulada negativamente através do inibidor SUFU no citosol, impedindo a transcrição desses fatores (Chinese Journal of Cancer, 30(7): 2011)

Meduloblastomas do subgrupo SHH são mais frequentes em crianças menores de 3 anos de idade e entre os adultos (maiores de 16 anos de idade) (Kool et al., 2012). A relação quanto à incidência entre os gêneros também é

de 1:1, como ocorre nos WNT (Kool, Korshunov et al., 2012). Quase todos os tumores histologicamente desmoplásicos pertencem ao subgrupo SHH, porém mais de 50% dos tumores SHH não são desmoplásicos (Taylor et al., 2012).

A identificação dos meduloblastomas pertencentes ao subgrupo SHH pode ser realizada através do perfil transcricional e o marcador imunohistoquímico SFRP1 é considerado útil na determinação desse subtipo (Taylor, et al., 2012).

O prognóstico dos meduloblastomas SHH é semelhante ao do Grupo 4, sendo intermediário entre o do subgrupo WNT e o do Grupo 3 (Giangaspero et al., 2007; Taylor et al., 2012).

1.1.3 Grupo 3

Tumores do Grupo 3 são frequentemente metastáticos e apresentam o pior prognóstico dentre os quatro subgrupos descritos (Taylor et al., 2012). A maior parte é de histologia clássica, embora a maioria dos tumores A/GC pertença a este subgrupo (Taylor et al., 2012). Meduloblastoma do Grupo 3 incide mais comumente no gênero masculino (relação de 2:1) e quase nunca é observado entre os adultos (Kool et al., 2012).

Semelhantemente ao subgrupo WNT, também apresenta altos níveis de expressão de *MYC*, embora indícios apontem que a amplificação desse gene parece estar limitada apenas ao Grupo 3 (Taylor et al., 2012). O isocromossomo 17q [perda do braço curto do cromossomo 17 (17p), resultando em um cromossomo anormal com a duplicação do seu braço longo] é encontrado em 26% dos tumores do Grupo 3 (Taylor et al., 2012). Tumores

deste subgrupo hiperexpressam genes que estão envolvidos no desenvolvimento da retina, cuja participação na patogênese dos meduloblastomas ainda não é conhecida (Taylor et al., 2012).

O melhor método descrito atualmente para definir o Grupo 3 é o perfil transcricional. No entanto, a positividade imuno-histoquímica para NPR3 é sugerida como marcadora deste subgrupo.

1.1.4 Grupo 4

Este subgrupo representa o protótipo epidemiológico do meduloblastoma: pico de incidência por volta dos 7 anos de idade, histologia clássica e presença de isocromossomo 17q (Taylor, Northcott et al. 2012). Apresenta prognóstico intermediário em relação aos subgrupos WNT e Grupo 3 (Taylor et al., 2012). A presença do isocromossomo 17q é fator independente de pior prognóstico e constitui-se na alteração citogenética mais comum, observada em 66% dos casos (Northcott et al., 2011; Kool et al., 2012). Outra alteração citogenética constante é a perda do cromossomo X, a qual ocorre em 80% dos meduloblastomas do Grupo 4 no gênero feminino (Taylor et al.. 2012).

Tumores do Grupo 4 parecem hiperexpressar genes envolvidos na diferenciação e no desenvolvimento neuronal, porém a relevância clínica desse dado ainda é desconhecida (Kool et al., 2008).

Da mesma forma que nos outros subgrupos, o melhor método descrito atualmente para identificar o Grupo 4 é através do perfil transcricional. No entanto, a positividade para o marcador imuno-histoquímico KCNA1 tem sido sugerida como marcadora desse subgrupo (Taylor, Northcott et al. 2012).

1.2 Marcadores subgrupo-específico

Conforme descrito anteriormente, uma metanálise internacional recolheu dados clínicos e moleculares de grande coorte contendo 550 casos de meduloblastomas, que foram estudados por perfil de expressão gênica (Kool et al., 2012). Para fins de validação, o estudo comparou os resultados obtidos com os de outra coorte contendo 402 casos diferentes, cujas informações sobre a relação com os subgrupos foram obtidas através de estudo imuno-histoquímico utilizando os quatro marcadores subgrupo-específicos descritos por Northcott e colaboradores (2011) e β -catenina. Os resultados de ambas as amostras apresentaram semelhanças em relação às características demográficas, histológicas e clínicas. Todavia, houve divergências principalmente quanto à distribuição entre os gêneros nos subgrupos e quanto à sobrevida (Kool et al., 2012). Os autores concluíram que a identificação dos subgrupos moleculares de meduloblastomas é o melhor fator para avaliar prognóstico, até o momento. No entanto, há necessidade de melhores marcadores capazes de identificar cada um dos subgrupos (Kool et al., 2012).

Embora Northcott et al. (2011) tenham mostrado que os quatro subgrupos de meduloblastoma podem ser definidos através de quatro marcadores imuno-histoquímicos (DKK1, SFRP1, NPR3 e KCNA1) com 98% de confiabilidade, o consenso atual apresentado por Taylor et al. (2012) admite que alguns tumores são positivos para mais de um marcador, ou até negativos para todos eles, requerendo o uso de mais de um anticorpo que supostamente selecione o mesmo subgrupo para a obtenção de resultados semelhantes aos descritos. (Tabela 1).

Tabela 1 - Marcadores imuno-histoquímicos utilizados para identificar os subgrupos de meduloblastoma

Antigens	Subgroup (s)	Antybod Sources	Company (Catalog#)	Dilution (s)
CTNNB1 (nuclear)	WNT	Mouse monoclonal	BD transduction laboratories (ab610154)	1:100
		Mouse monoclonal	Ventana (760-4242)	1:800 N/A
		N/A	Cell signaling technologies	1:500
DKK1	WNT	Mouse monoclonal	Abnova (H0002293 – M11)	1:100
SFRP1	WNT	Rabbit polyclonal	Abcam (ab 4193)	1:2,000
GLI1	SHH	Rabbit polyclonal	Millipore (ab 3444)	1:5,000
		Goat polyclonal	Santa Cruz biotechnology (sc.6152)	N/A
GAB1	SHH	Rabbit polyclonal	Abcam (ab 27439)	1:50
FILA	WNT/SHH	Mouse monoclonal	Fitzgerald (1OR – F113A)	1:100
YAP1	WNT/SHH	Mouse monoclonal	Santa Cruz (sc – 101199)	1:50
NPR3	Group C	Rabbit polyclonal	Abcam (ab 37617)	1:200
	Group C	Rabbit polyclonal	Sigma (HPA 031065)	1:30
KCNA1	Group D	Rabbit polyclonal	Abcam (ab 32433)	1: 2,000

Fonte: Adaptada de Taylor et al., 2012

1.3 Outros possíveis marcadores prognósticos

Apesar de a divisão em subgrupos moleculares de meduloblastomas ser conhecida e necessária devido à importância clínica, não podemos abandonar estudos prévios que fazem referência a outros marcadores descritos como prognósticos. Um exemplo é a mutação do gene *TP53* (que pode ser indiretamente observada quando há forte e extensa expressão imuno-histoquímica da proteína p53) que ocorre em diversos subgrupos e é referida como fator de pior prognóstico (Pfaff et al., 2010; Tabori et al., 2010; Taylor et

al., 2012). À seguir, são descritos alguns desses estudos, que discorrem sobre outros possíveis marcadores de importância prognóstica de mais fácil execução na rotina prática, pois são marcadores imuno-histoquímicos.

1.3.1 p53

Como fator transcricional multifuncional, a proteína supressora tumoral p53 (codificada pelo gene *TP53*) está envolvida em múltiplas vias celulares relacionadas: ao reparo do DNA; ao controle do ciclo celular; à diferenciação e senescência celular; à indução da apoptose; ao controle da proliferação celular e da angiogênese (Pfaff et al., 2010). (Figura 6)

Mutações em *TP53* são esporádicas na maioria dos casos e ocorrem em aproximadamente 50% de todos os cânceres humanos (Pfaff et al., 2010).

Figura 6 - Resposta mediada por p53. p53 existe em baixa concentração nas células não estressadas. Sob condições estressantes, a proteína p53 acumula na célula de uma forma tetramérica e induz à transcrição de vários genes que estão envolvidos no controle do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA, diferenciação e senescência. A perda da atividade do supressor tumoral p53 por mutação / deleção de *TP53* ou inibição de p53, permite a proliferação das células que estão lesadas. Essa proliferação descontrolada pode levar ao desenvolvimento tumoral (Chene, 2003)

Apenas a positividade imuno-histoquímica nuclear forte e difusa correlaciona-se com a mutação do gene *TP53* (Tabori et al., 2010; Moschovi, et al., 2011). Estudos recentes analisaram mutações no gene *TP53* em meduloblastomas; no entanto, seu significado prognóstico permanece controverso (Moschovi et al., 2011).

Um estudo sequenciou o gene *TP53* em 49 casos de meduloblastomas e encontrou mutação em 18% deles, além de sensibilidade de 100% e especificidade de 83% para o teste imuno-histoquímico de p53 na detecção da mutação do gene *TP53*. Todos os tumores que exibiram mutação recorreram precocemente, sendo que a sobrevida em 5 anos foi de 0% nos pacientes com mutação de *TP53* comparada com 74% nos casos em que não foi encontrada mutação. Em análise multivariada, a mutação de *TP53* foi fortemente

associada com fator prognóstico adverso. Para os autores, a disfunção da via p53 pode causar resistência à quimioterapia / radioterapia, influenciando a recorrência da neoplasia (Tabori et al., 2010).

Por outro lado, outro estudo analisou o gene *TP53* em 310 meduloblastomas, encontrando mutação em apenas 6,8% dos casos, o que não foi associado a prognóstico desfavorável (Pfaff et al., 2010). Os autores analisaram também a expressão de p53 em 187 tumores e encontraram sensibilidade de 82% e especificidade de 98% para o teste imuno-histoquímico em detectar mutação do gene.

Um grupo estudou a expressão imuno-histoquímica de p53 em 18 meduloblastomas de adultos (mais de 16 anos) e encontrou positividade nuclear fraca em apenas 4 casos (22,2%) (Onguru et al., 2010). Outro grupo encontrou índice ainda menor: apenas 3 casos de 35 meduloblastomas pediátricos estudados (8,5%) foram positivos para p53, sem correlação com o prognóstico (Ertan et al., 2009).

Alguns autores detectaram expressão de p53 em 87,5% dos 40 casos pesquisados. Em 40% deles a expressão de p53 foi maior do que 15% e esses pacientes apresentaram pior prognóstico. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Moschovi et al., 2011).

1.3.2 Ciclina D1 e p16

Ciclina D1 é expressa em 40% dos meduloblastomas esporádicos (Saab, Rodriguez-Galindo et al. 2009). Embora o mecanismo molecular para a patogênese do meduloblastoma ainda seja desconhecido, a via final comum

parece ser a ruptura dos mecanismos envolvidos na regulação da progressão do ciclo celular, ocasionando proliferação celular descontrolada (Zhao, Song et al. 2010). O ponto crítico na regulação do ciclo celular é a fase G1, que determina se a célula sairá do ciclo celular e irá para o estado quiescente (G0) ou entrará na fase S e prosseguirá para a divisão celular. A regulação da transição G1-S do ciclo celular depende da fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), a qual é controlada por grande número de outras proteínas (ex., as ciclinas). Pela interação com quinases dependentes das ciclinas 4 e 6 (CDK-4/6), ciclina D1 forma um complexo que inativa pRb, resultando em uma série de eventos que permitem à célula entrar na fase S e sofrer divisão celular (Saab, Rodriguez-Galindo et al. 2009).

Por outro lado, a progressão da fase G1 para a fase S é bloqueada por uma potente proteína supressora de tumor (p16), que interage especificamente com ciclina D1, inibindo a atividade de CDK-4 (Krecicki, Smigiel et al. 2004). Deleções, mutações ou metilações do gene *p16* têm sido implicadas no desenvolvimento de grande variedade de malignidades humanas como, por exemplo, o carcinoma epidermóide de laringe (Fu, Ma et al. 2008). (Figura 7)

Figura 7 - Regulação do ciclo celular. Sinalização mitogênica extracelular faz com que a ciclina D1 interaja com CDK4/6, formando um complexo que fosforila e inativa a proteína supressora tumoral RB, levando à dissociação de fatores de transcrição E2F e regulação transcricional de genes importantes para a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. A progressão da fase G1 para S pode ser bloqueada por p16 e p21, que interagem com a ciclina D1, inibindo a ativação de CDK4 (Lange, Yee, 2011)

O papel biológico de ciclina D1 e p16 no meduloblastoma não está elucidado. Um estudo avaliou a expressão imuno-histoquímica de ciclina D1 e p16 em 42 meduloblastomas pediátricos e em 42 amostras de cerebelo normal, encontrando expressão significativamente maior de ciclina D1 nos meduloblastomas em relação à marcação no cerebelo normal (69,05% versus 9,5%) e menor de p16 (42,9% versus 85,7%) (Zhao et al., 2010). Os autores também encontraram maior expressão de ciclina D1 nos casos metastáticos, nos casos em que havia presença de necrose e nos meduloblastomas clássicos e A/GC. Em relação ao p16, houve expressão menor para os mesmos parâmetros citados, inferindo, portanto, correlação imuno-histoquímica negativa entre ciclina D1 e p16. Além disso, para diferentes estágios

metastáticos, a sobrevida em cinco anos dos pacientes com expressão positiva para ciclina D1 e negativa para p16 foi significativamente menor do que para aqueles com expressão negativa para ciclina D1 e positiva para p16.

Outro estudo encontrou positividade imuno-histoquímica para ciclina D1 em 43% de 180 casos de meduloblastomas analisados e esses casos também apresentaram sobrevida global desfavorável (Neben et al., 2004).

1.3.3 Bcl-2

Bcl-2 é um proto-oncogene originalmente identificado no linfoma folicular de células B, cujo papel fundamental é inibir a apoptose através de uma complexa cascata de eventos intracelulares, contribuindo para a tumorigênese (Schuller et al., 2004). Também está envolvido na regulação das células precursoras embrionárias do cerebelo (dentro da camada granular externa do cerebelo, precursores neuronais expressam a proteína *bcl-2*). Esses dados sugerem que a tumorigênese do meduloblastoma está relacionada, entre outros aspectos, com a desregulação na apoptose possivelmente causada pela hiperexpressão de *bcl-2* (Schuller et al., 2004).

Um estudo encontrou positividade imuno-histoquímica para *bcl-2* em 32,7% dos casos (34 de 104 meduloblastomas), sendo que 67% de positividade foi encontrada nos meduloblastomas desmoplásicos e apenas 23% nos clássicos (Schuller et al., 2004).

Outro estudo, comparando a expressão da proteína *bcl-2* com sobrevida, demonstrou correlação significativa entre a baixa expressão e a melhora na sobrevida livre de doença, além de tendência de expressão mais forte e difusa

de bcl-2 em pacientes com doença recorrente. Esses achados corroboram a hipótese de que a expressão imuno-histoquímica positiva de bcl-2 seria marcador de mau prognóstico entre os meduloblastomas (Das et al., 2009).

Um grupo de pesquisadores estudou a expressão imuno-histoquímica de bcl-2 em 18 meduloblastomas de adultos e encontrou positividade fraca em apenas 1 caso (Onguru et al., 2010). Esse achado foi similar aos dados de outro grupo, que encontrou expressão de bcl-2 em apenas 5% dos 69 meduloblastomas de adultos pesquisados (Sarkar et al., 2002). No entanto, ainda outro estudo encontrou expressão de bcl-2 em 27,5% dos 40 casos analisados, sendo que 15% desses apresentaram expressão em mais de 30% das células neoplásicas, o que foi associado significativamente com pior sobrevida (Moschovi et al., 2011).

1.3.4 HER2

HER2/neu (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano) é um proto-oncogene conhecido por vários nomes e grafias diferentes (*c-erbB-2*; *cerbB-2*; *C-erbB-2*; *HER-2*; *HER-2/neu*; *ERBB2*; *erbB2*; *erbB-2*; *neu/c-erbB-2*; *oncogene neu*; *proteína neu*; *neu*). No presente estudo, será adotado o termo “HER2”.

A oncoproteína codificada é membro da família EGFR/HER, uma família de receptores de fatores de crescimento transmembrana tirosina quinase composto por quatro membros (HER1, também conhecido como EGFR, HER2, HER3 e HER4) e envolvida em vias de sinalização intracelular promotoras do crescimento celular. O gene *HER2* encontra-se no cromossomo 17q21 e

codifica uma proteína receptora transmembrana encontrada em vários tecidos. A amplificação ou desregulação transcricional desse gene resulta em ativação exagerada de pelo menos três vias diferentes envolvendo P13K, AKT e MAPK, ocasionando proliferação, migração, invasão celular e evasão da apoptose (Waage et al., 2013). (Figura 8)

Figura 8 - Via de sinalização de HER2. HER é uma família de receptores de fatores de crescimento transmembrana tirosina quinase composta por quatro membros: HER1 ou EGFR, HER2, HER3 e HER4. O HER2 não possui ligante conhecido e sua ativação ocorre através da heterodimerização com um dos outros membros da família. Essa ligação desencadeia uma cascata de sinais através de P13K/ERK, Akt, Ras e MAPK, que resulta na proliferação e aumento da sobrevivência celular. A terapia alvo anti-HER2 (trastuzumab) bloqueia a ativação de HER2, impedindo o acionamento da cascata. (Perik, de Korte et al. 2007).

Alguns estudos descrevem que a hiperexpressão de *HER2* pode ocorrer nos meduloblastomas e estaria associada a pior prognóstico (a hiperexpressão

gênica pode ser detectada através da positividade imuno-histoquímica forte e completa na membrana citoplasmática em pelo menos 10% das células tumorais, o que é feito rotineiramente para carcinomas mamários) (de Haas, et al., 2008; Kim et al., 2011). Essa associação teria implicações terapêuticas importantes, pois os pacientes poderiam se beneficiar de terapias- alvo anti-HER2, como trastuzumab (Herceptin®) e lapatinib (Tykerb®), usados no tratamento do câncer de mama com amplificação do gene *HER-2*.

No entanto, os resultados variam amplamente na literatura. Um grupo de pesquisadores encontrou 78% de positividade para HER2, sendo 28% de alta expressão (relatado pelo grupo como tendo mais de 50% das células tumorais marcadas pelo método imuno-histoquímico). A alta expressão para HER2 foi correlacionada significativamente com pior prognóstico (Gilbertson et al., 2001). O mesmo grupo, em 1995, havia encontrado positividade de 83,6% (Gilbertson et al., 1995). Outro grupo encontrou positividade de 40% através do método de Western blot (Gajjar, Hernan et al. 2004). Outro estudo encontrou apenas 16% de positividade pelo método imuno-histoquímico (Ray et al., 2004). Tabori e colaboradores encontraram positividade forte e difusa (em mais de 50% das células tumorais) em 18% dos 108 meduloblastomas analisados (Tabori, Baskin et al. 2010). Já outro grupo encontrou positividade imuno-histoquímica membranosa em 90% dos casos (27 de 30 casos), mas sem nenhuma associação significativa com o prognóstico ou com o subtipo histológico (Das, Puri et al. 2009). Entretanto, outro estudo, que pesquisou a presença de hiperexpressão de *HER2* em 23 amostras de meduloblastomas por três diferentes técnicas (imuno-histoquímica, FISH e PCR), não encontrou positividade em nenhuma delas (Entz-Werle et al., 2008).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

- a) Analisar a expressão proteica de DKK1, SFRP1, NPR3, KCNA1, β -catenina, ciclina D1, p16, p53, bcl-2 e HER2 através do método imuno-histoquímico e determinar a frequência de positividade na amostra estudada;
- b) Correlacionar os achados da expressão imuno-histoquímica para cada anticorpo com os seguintes dados: gênero, faixa etária no diagnóstico, tipo histológico, presença de metástase no diagnóstico, recidiva e grupos de risco;
- c) Correlacionar os dados demográficos, histológicos e clínicos e os achados da expressão imuno-histoquímica para cada anticorpo com a sobrevida global e tempo livre de doença;
- d) Definir os subgrupos de meduloblastoma, nesta amostra, através da frequência de positividade para os marcadores: β -catenina, DKK1, SFRP1, NPR3, KCNA1.

3 MÉTODOS

3.1 Amostra

Foram separados 65 blocos de parafina de tumores (armazenados no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica) de 65 pacientes com meduloblastoma, admitidos no Hospital do Câncer de Barretos / Fundação Pio XII no período de 1994 a 2012.

Dados demográficos, histológicos e clínicos foram obtidos retrospectivamente pelos prontuários médicos e organizados em fichas de coletas criadas especificamente para essa finalidade. As lâminas correspondentes aos blocos foram reavaliadas por dois patologistas (SR e GCA) para confirmação diagnóstica e subclassificação histológica de acordo com as orientações da Organização Mundial da Saúde (Giangaspero et al., 2007). Nessa reavaliação, quatro amostras foram rejeitadas pela não confirmação de diagnóstico de meduloblastoma, resultando em amostra final constituída por 61 casos.

Os tumores foram sub classificados histologicamente como: clássico, desmoplásico nodular, extensa nodularidade e A/GC. Os tipos desmoplásico nodular e extensa nodularidade foram agrupados e denominados em conjunto como “desmoplásicos”.

A idade dos pacientes foi categorizada em 3 grupos de importância clínica devido às diferenças prognósticas entre as faixas etárias: crianças menores de 3 anos de idade (< 3 anos); crianças e jovens entre 3 e 16 anos de idade (≥ 3 e ≤ 16 anos); jovens e adultos com mais de 16 anos de idade (> 16

anos) (Kool et al., 2012). Idade e presença ou ausência de metástase / disseminação leptomeníngea foram avaliadas no momento do diagnóstico.

Grau de ressecção cirúrgica foi categorizado em 2 grupos: ressecção total (ressecção completa ou menos de $1,5\text{cm}^2$ de tumor residual após a cirurgia) e ressecção parcial (se mais de $1,5\text{cm}^2$ de tumor residual após a cirurgia). Análise quantitativa de remanescente tumoral – maior ou menor de $1,5\text{cm}^2$ – foi realizada por meio de Ressonância Magnética (RM) ou Tomografia Computadorizada (TC) de encéfalo após a cirurgia.

Os casos foram categorizados em 2 grupos de risco para análise de sobrevida da seguinte maneira: 1) “risco padrão”: pacientes com idade ≥ 3 anos, com tumores totalmente ressecados e sem disseminação leptomeníngea ou doença metastática ao diagnóstico; 2) “alto risco”: demais casos (Giangaspero et al., 2007; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011).

3.2 Estudo imuno-histoquímico

O bloco de parafina mais representativo de cada caso foi separado para realização das lâminas de imuno-histoquímica, utilizando-se lâmina com carga positiva Starfrost® (Knittel, Braunschweig, Alemanha). Foram utilizados três métodos automatizados diferentes, decorrentes dos melhores resultados na padronização dos anticorpos. Os métodos utilizados para cada anticorpo e suas respectivas especificações estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos métodos e anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica

ANTICORPOS	TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA	
	EQUIPAMENTO AUTOMATIZADO	ESPECIFICAÇÕES DO ANTICORPO
P53	Autostainer Link 48, Dako®	Mouse monoclonal – clone DO-7 M-7001, Dako®, high pH, 30 minutos de incubação
Ciclina D1	Autostainer Link 48, Dako®	Flex Cyclin D1, RxH (SP4), Dako®, high pH, 20 minutos de incubação
P16	Ventana Benchmark XT, Roche®	p16 ^{INK4a} , clone E6H4 ^{IM} , Cintec®
Bcl2	Autostainer Link 48, Dako®	Flex BCL2 Oncoprotein, MxH (124) Dako®, high pH, 30 minutos de incubação
HER2	Ventana Benchmark XT, Roche®	Anti-HER-2/neu (4B5) rabbit monoclonal – reference 790-2991 – Roche®
β-catenina	Autostainer Link 48, Dako®	Flex Beta-Catenin, MxH (Beta-Catenin-1), Dako®, high pH, 20 minutos de incubação
DKK1	Ventana Ultra, Roche®	Abnova® H00022943-M11) – 1:3000, low pH
SFRP1	Ventana Ultra, Roche®	Abcam® ab4193-100) – 1:35, high pH
NPR3	Ventana Ultra, Roche®	Abcam® ab37617-100) – 1:200, high pH
KCNA1	Ventana Ultra, Roche®	Abcam® ab32433-100) – 1:2000, low pH

Os controles positivos que acompanharam as reações e o padrão de marcação imuno-histoquímica analisado em cada reação são descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Descrição dos anticorpos com os respectivos padrões de marcação para análise imuno-histoquímica e os controles positivos que acompanharam as reações

Anticorpo	Controle positivo	Padrão de marcação
<i>p53</i>	adenocarcinoma	núcleo
<i>CiclinaD1</i>	amígdala	núcleo
<i>p16</i>	vulva comprometida pelo vírus HPV	citoplasma
<i>bcl2</i>	linfonodo	membrana citoplasmática e citoplasma
<i>HER2</i>	carcinoma invasivo de mama positivo +++/+++	membrana citoplasmática
<i>β-catenina</i>	fibromatose músculo-aponeurótica	núcleo
<i>DKK1</i>	placenta	membrana citoplasmática e citoplasma
<i>SFRP1</i>	testículo	membrana citoplasmática e citoplasma
<i>NPR3</i>	carcinoma invasivo da mama	membrana citoplasmática e citoplasma
<i>KCNA1</i>	fígado, cérebro e músculo cardíaco	membrana citoplasmática e citoplasma

Todas as reações imuno-histoquímicas foram analisadas de forma semiquantitativa (quantidade de marcação nas células tumorais em porcentagem estimada) e qualitativa (intensidade da marcação) da seguinte maneira:

Análise semiquantitativa:

- Negativo: quando 10% ou menos das células tumorais expressaram o marcador de interesse;

- Positivo: quando mais de 10% das células tumorais expressaram o marcador de interesse.

Observação: Para o anticorpo p53, foi considerado negativo se 20% ou menos das células tumorais estivessem marcadas, e positivo se mais de 20% estivessem marcadas.

Análise qualitativa:

- Intensidade fraca de marcação;
- Intensidade moderada / forte de marcação.

Apenas os casos com mais de 10% das células tumorais marcadas (mais de 20% no caso de p53) e com intensidade moderada / forte foram considerados positivos na análise dos resultados. Essa padronização foi definida tendo como base o que a maioria dos estudos que realizaram imuno-histoquímica para esses anticorpos em meduloblastomas consideraram como “positivo” (Srikantha et al., 2010; Das et al., 2009; Zhao et al., 2010; Min et al., 2013; Silva et al., 2013).

As marcas e clones utilizados no estudo imuno-histoquímico para DKK1, NPR3, KCNA1 e SFRP1 foram os mesmos utilizados no estudo original (Northcott et al., 2011). As diluições utilizadas foram diferentes. No presente estudo, foi considerado como positivo a marcação de 10% ou mais das células tumorais para esses marcadores, apesar de o estudo original não explicitar sua definição de positividade.

Somente os casos positivos exclusivos para os marcadores β -catenina, DKK1, SFRP1, NPR3 e KCNA1 foram contabilizados na classificação entre os subgrupos de meduloblastomas. No caso do subgrupo WNT, tanto DKK1 como β -catenina são considerados marcadores. Portanto, para sua classificação,

foram considerados os casos positivos exclusivos para DKK1 e / ou β -catenina que não foram positivos concomitantemente para nenhum dos outros três marcadores.

3.3 Estatística

Para as variáveis qualitativas, foram calculadas as frequências e porcentagens. Foi testada a associação entre variáveis qualitativas pelo teste exato de Fisher.

Para a análise de sobrevida global, foi considerado como data inicial a data do diagnóstico e a data final como a data do óbito ou da última informação obtida em prontuário. Para a análise de sobrevida livre de doença, foi considerada como data inicial a data do exame de imagem do encéfalo e da medula no qual se constatou ausência de sinais de neoplasia, e como data final a data da recidiva ou do óbito. A recidiva foi definida como reaparecimento de imagem compatível com neoplasia no exame de imagem no mesmo local do tumor original ou em qualquer outro local.

Análises de sobrevida global e sobrevida livre de doença foram realizadas através da construção de curvas de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas foi realizada pelo teste log-rank. Para todas as análises, considerou-se o nível de significância de 5% e utilizou-se o software estatístico SPSS v.21 for Windows.

3.4 Ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (protocolo de pesquisa nº 0317/10) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII (Projeto de pesquisa nº 270/2009).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Descrição da casuística

Foram avaliados 61 casos de meduloblastomas, dos quais 37 eram do gênero masculino e 24 do gênero feminino (relação de cerca de 1,5:1).

A idade variou entre 1 e 35 anos e o pico de incidência ocorreu entre 10 e 11 anos. Apenas quatro pacientes tinham menos de três anos de idade.

Quanto ao tipo histológico, a maioria era do tipo clássico (41 casos) e a minoria era do tipo anaplásico / grandes células (cinco casos). Três casos foram classificados como sendo do tipo extensa nodularidade e foram agrupados com 12 casos do tipo desmoplásico nodular e classificados como tumores desmoplásicos.

Sete casos apresentavam metástases no momento do diagnóstico e seis casos apresentaram recidiva.

Os dois grupos de risco estavam semelhantemente distribuídos, sendo 30 casos com “risco padrão” e 31 casos com “alto risco”. A descrição completa dos dados demográficos, histológicos e clínicos encontra-se na tabela 4.

Tabela 4 - Dados quantitativos das variáveis demográficas, histológicas e clínicas (Hospital de Câncer de Barretos, 1994 – 2012)

Variável		N (%) N=61
Gênero	Feminino	24 (39,3)
	Masculino	37 (60,7)
Faixa etária no diagnóstico	< 3 anos	4 (6,6)
	3-16 anos	34 (55,7)
	>16 anos	23 (37,7)
Histologia	Clássico	41 (67,2)
	Desmoplásico	15 (24,6)
	A/GC	5 (8,2)
Metástase ao diagnóstico	Presente	7 (11,5)
	Ausente	54 (88,5)
Recidiva	Sim	6 (9,8)
	Não	55 (90,2)
Grupo de risco	Alto	31 (50,8)
	Padrão	30 (49,2)
Cirurgia	Ressecção total	34 (55,7)
	Ressecção parcial	27 (44,3)
Tratamento	Cirurgia+QT+RT	51 (83,6)
	Cirurgia	7 (11,5)
	Cirurgia+RT	2 (3,3)
	Cirurgia+QT	1 (1,6)
Status	Vivo com doença	4 (6,6)
	Vivo sem doença	31 (50,8)
	Óbito por câncer	15 (24,6)
	Óbito por complicações do tratamento	8 (13,1)
	Óbito por outras causas	3 (4,9)

A/GC: tipo histológico anaplásico / grandes células; QT: quimioterapia; RT: radioterapia

A frequência entre os gêneros masculino e feminino nos pacientes acima de 3 anos de idade apresentou uma relação de cerca de 1,5:1. No entanto, entre os pacientes abaixo de 3 anos de idade, a relação foi de 3:1. Não houve

relação estatisticamente significativa quanto à distribuição dos tipos histológicos: a maior percentagem dos casos clássicos (58,5%) e dos A/GC (80,0%), pertenceu à faixa etária entre três e 16 anos de idade. Na faixa etária menor de três anos, não houve nenhum caso de histologia A/GC. A descrição completa das frequências dos dados demográficos, histológicos e clínicos entre as diferentes faixas etárias encontra-se na tabela 5.

Tabela 5 - Correlação da faixa etária com diferentes variáveis; N (%)

Variável	Faixa etária			Valor de p*
	< 3	3 - 16	> 16	
Gênero				
Feminino	1 (4,2)	14 (58,3)	9 (37,5)	0,99
Masculino	3 (8,1)	20 (54,1)	14 (37,8)	
Histologia				
Clássico	2 (4,9)	24 (58,5)	15 (36,6)	0,43
Desmoplásico	2 (13,3)	6 (40,0)	7 (46,7)	
A/GC	0	4 (80,0)	1 (20,0)	
Metástase				
Presente	1 (14,3)	4 (57,1)	2 (28,6)	0,52
Ausente	3 (5,6)	30 (55,6)	21 (38,9)	
Recidiva				
Presente	0	3 (50,0)	3 (50,0)	0,78
Ausente	4 (7,3)	31 (56,4)	20 (36,4)	

* Teste exato de Fisher

A média de tempo de seguimento foi de 47 meses, variando entre um e 199 meses. A taxa de sobrevida global em cinco anos correspondeu a 62,2% e, em 10 anos, a 39%. A sobrevida livre de doença em cinco anos correspondeu a 77,8% e, em 10 anos, a 51,9%. Os gráficos 1 e 2 demonstram respectivamente as curvas de sobrevida global e livre de doença da amostra.

Gráfico 1 – Curva de sobrevida global de acordo com o método de Kaplan Meier

Gráfico 2 – Curva de sobrevida livre de doença de acordo com o método de Kaplan Meier

4.2 Análise imuno-histoquímica

Maior frequência de expressão positiva ocorreu com p16 (29 casos positivos), e a menor ocorreu com HER2 (nenhum caso foi positivo). β -catenina foi positivo em 15 casos (24,6%). A positividade de p53, ciclina D1 e bcl2 foi semelhante entre eles (entre 8 e 9 casos). Os resultados encontrados para cada anticorpo estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do estudo imuno-histoquímico para todos os anticorpos analisados

Anticorpo	Negativo N (%)	Positivo N (%)	Total N
<i>p53</i>	53 (86,9)	8 (13,1)	61
<i>Ciclina D1</i>	53 (86,9)	8 (13,1)	61
<i>p16</i>	32 (52,5)	29 (47,5)	61
<i>Bcl-2</i>	52 (85,2)	9 (14,8)	61
<i>HER2</i>	61 (100)	0 (0)	61
<i>β-catenina</i>	46 (75,4)	15 (24,6)	61
<i>DKK1</i>	40 (65,6)	21 (34,4)	61
<i>SFRP1#</i>	54 (88,5)	5 (8,2)	59
<i>NPR3</i>	47 (77,0)	14 (23,0)	61
<i>KCNA1</i>	36 (59,0)	25 (41,0)	61

Dois casos não avaliáveis (descolamento do material durante a técnica de imuno-histoquímica)

A positividade descrita na tabela 6 para os cinco marcadores dos subgrupos (β -catenina, DKK1, SFRP1, NPR3 e KCNA1) não é exclusiva.

A tabela 7 descreve apenas a positividade exclusiva para esses marcadores. Dos 61 casos analisados, apenas 22 foram positivos exclusivos.

Entre os quatro marcadores descritos como subgrupo-específicos (DKK1, SFRP1, NPR3 e KCNA1), 21 casos foram negativos para todos eles, 15 foram positivos para dois deles, cinco foram positivos para três deles e nenhum caso foi positivo para todos os marcadores concomitantemente.

Tabela 7 - Descrição da positividade exclusiva para os marcadores representativos dos subgrupos de meduloblastoma

Anticorpo	Positivos exclusivos N (%)	Total N
<i>β-catenina</i>	4 (6,5)	61
<i>DKK1</i>	8 (13,1)	61
<i>SFRP1#</i>	1 (1,6)	59
<i>NPR3</i>	3 (4,9)	61
<i>KCNA1</i>	6 (9,8)	61

Dois casos não avaliáveis (descolamento do material durante a técnica de imuno-histoquímica)

As imagens dos casos em que a marcação imuno-histoquímica foi positiva são mostradas na figura 9.

Figura 9 - Imagens de casos com marcação imuno-histoquímica positiva. a: p53 (200x). b: ciclina D1 (400x). c: p16 (200x); d: bcl2 (100X); e: β -catenina (100x); f: DKK1 (200x); g: SFRP1 (200X); h: NPR3 (200x); i: KCNA1 (200x).

4.3 Correlação da frequência de positividade dos marcadores com dados demográficos, histológicos e clínicos

Dentre os casos positivos exclusivos para β -catenina, todos pertenciam ao gênero feminino ($p=0,01$). Não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre a expressão dos demais marcadores e as variáveis analisadas (gênero, faixa etária, histologia, metástase no diagnóstico, recidiva e grupos de risco). A análise completa dessas associações está demonstrada na tabela 8.

Tabela 8 - Análise da marcação imuno-histoquímica positiva de acordo com as diferentes variáveis; N (%)

	p53	ciclinaD1	p16	bcl2	β-catenina exclusivos	DKK1 exclusivos	SFRP1 exclusivos	NPR3 exclusivos	KCNA1 exclusivos
Gênero									
Feminino	3 (12,5)	3 (12,5)	12 (50,0)	4 (16,7)	4 (22,2)	2 (10,5)	0	1 (5,3)	2 (11,8)
Masculino	5 (13,5)	5 (13,5)	17 (45,9)	5 (13,5)	0	4 (14,8)	1 (2,9)	2 (6,7)	4 (16,0)
Valor de p*	0,99	0,99	0,80	0,73	0,01	0,99	0,99	0,99	0,99
Faixa etária									
< 3 anos	1 (25,0)	2 (50,0)	0	1 (25,0)	0	0	0	0	0
3-16 anos	6 (17,6)	4 (11,8)	17 (50,0)	6 (17,6)	3 (11,5)	5 (20,0)	0	2 (6,7)	4 (18,2)
>16 anos	1 (4,3)	2 (8,7)	12 (52,2)	2 (8,7)	1 (4,8)	1 (5,3)	1 (5,0)	1 (6,2)	2 (11,1)
Valor de p*	0,23	0,12	0,19	0,42	0,70	0,41	0,43	0,99	0,76
Histologia									
Clássico	3 (7,3)	8 (19,5)	20 (48,8)	4 (9,8)	2 (6,5)	3 (10,0)	1 (2,7)	2 (6,5)	3 (11,5)
Desmopl.	4 (26,7)	0	5 (33,3)	5 (33,3)	2 (14,3)	2 (15,4)	0	1 (7,7)	2 (15,4)
A/GC	1 (20,0)	0	4 (80,0)	0	0	1 (33,3)	0	0	1 (33,3)
Valor de p*	0,09	0,12	0,20	0,07	0,73	0,34	0,99	0,99	0,47
Metástase									
Presente	2 (28,6)	2 (28,6)	5 (71,4)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (25,0)	0	0	2 (50,0)
Ausente	6 (11,1)	6 (11,1)	24 (44,4)	8 (14,8)	3 (7,0)	5 (11,9)	1 (2,1)	3 (7,1)	4 (10,5)
Valor de p*	0,23	0,23	0,24	0,99	0,46	0,44	0,99	0,99	0,09
Recidiva									
Sim	0	0	3 (50,0)	1 (16,7)	0	0	0	0	1 (33,3)
Não	8 (14,5)	8 (14,5)	26 (47,3)	8 (14,5)	4 (8,7)	6 (14,3)	1 (2,0)	3 (6,7)	5 (12,8)
Valor de p*	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,38
Grupo de risco									
Alto	7 (22,6)	7 (22,6)	16 (51,6)	7 (22,6)	3 (11,1)	2 (8,7)	0	2 (8,3)	2 (10,5)
Padrão	1 (3,3)	1 (3,3)	13 (43,3)	2 (6,7)	1 (4,3)	4 (17,4)	1 (3,7)	1 (4,0)	4 (17,4)
Valor de p*	0,05	0,05	0,61	0,15	0,61	0,66	0,49	0,60	0,67

* Teste exato de Fisher. A/GC: tipo histológico anaplásico / grandes célula

4.4 Correlação dos dados demográficos, histológicos e clínicos e da positividade para os marcadores com a sobrevida global

Dentre os pacientes com menos de três anos de idade, apenas 25% deles estavam vivos após cinco anos de seguimento. No entanto, quase 70% dos pacientes entre três e 16 anos estavam vivos no mesmo período ($p=0,02$). As curvas da sobrevida global, segundo a faixa etária considerada no momento do diagnóstico, estão demonstradas no gráfico 3.

Gráfico 3 - Curvas de sobrevida global segundo a faixa etária no diagnóstico

Os casos do gênero masculino apresentaram mais do que o dobro da média de sobrevida em relação aos casos do gênero feminino (130,1 meses para o masculino e 62,2 meses para o feminino) – $p=0,03$. As curvas da sobrevida global segundo o gênero estão demonstradas no gráfico 4.

Gráfico 4 - Curvas de sobrevida global segundo o gênero

Quanto à sobrevida global entre os tipos histológicos, os casos A/GC apresentaram sobrevida média de 47,6 meses; a sobrevida global correspondente ao tipo clássico foi de aproximadamente 110 meses. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,58$).

Casos que apresentavam metástase no momento do diagnóstico apresentaram sobrevida em cinco anos de apenas 17,1%, enquanto que os não-metastáticos apresentaram sobrevida de quase 70% ($p=0,01$). Da mesma

forma, os casos considerados de “alto risco” apresentaram sobrevida em cinco anos de 39,0%, enquanto que os de “risco padrão” apresentaram mais de 85,0% de sobrevida, no mesmo período ($p<0,01$). As curvas da sobrevida global segundo metástase e risco estão demonstradas nos gráficos 5 e 6 respectivamente.

Gráfico 5 – Curvas de sobrevida global segundo metástase

Gráfico 6 – Curvas de sobrevida global segundo grupos de risco

A análise completa da sobrevida global para todas as variáveis descritas acima encontra-se na tabela 9.

Tabela 9 - Análise de sobrevida global entre variáveis demográficas, histológicas e clínicas

Sobrevida global					
Variável	Total de casos	Total de eventos	Tempo médio de sobrevida (meses)	Taxa de sobrevida global em 5 anos (%)	Valor de <i>p</i> *
Faixa etária					
< 3 anos	4	3	14,9	25,0	0,02
3 - 16 anos	34	12	104,6	69,2	
>16 anos	23	11	96,7	58,5	
Gênero					
Feminino	24	14	62,2	52,5	0,03
Masculino	37	12	130,1	68,5	
Histologia					
Clássico	41	16	109,4	63,1	0,58
Desmoplásico	15	7	77,2	60,0	
A/GC	5	3	47,6	60,0	
Metástase					
Presente	7	5	26,5	17,1	0,01
Ausente	54	21	113,5	67,8	
Risco					
Alto	31	19	64,4	39,0	<0,01
Padrão	30	7	137,2	85,8	

* Teste de Log-Rank. A/GC: tipo histológico anaplásico / grandes células

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a sobrevida global e a expressão imuno-histoquímica para nenhum dos marcadores analisados. (Tabelas 10 e 11)

Tabela 10 - Análise de sobrevida global entre os marcadores p53, ciclina D1, p16 e bcl2

Sobrevida global					
Variável	Total de casos	Total de eventos	Tempo médio de sobrevida (meses)	Taxa de sobrevida global em 5 anos (%)	Valor de <i>p</i> *
p53					
Positivo	8	4	26,5	42,9	0,23
Negativo	53	22	110,1	64,9	
Ciclina D1					
Positivo	8	3	43,6	58,3	0,67
Negativo	53	23	107,2	63,0	
p16					
Positivo	29	14	65,3	53,5	0,25
Negativo	32	12	123,2	68,6	
Bcl-2					
Positivo	9	5	57,8	50,8	0,30
Negativo	52	21	110,3	64,0	

* Teste de Log-Rank.

Tabela 11 - Análise de sobrevida global entre os marcadores representativos dos subgrupos de meduloblastoma com positividade exclusiva

Sobrevida global					
Variável	Total de casos	Total de eventos	Tempo médio de sobrevida (meses)	Taxa de sobrevida global em 5 anos (%)	Valor de <i>p</i> *
β-catenina / DKK1					
Positivo	12	6	96,5	54,5	0,39
Negativo	32	11	107,6	70,3	
SFRP1					
Positivo	1	0	-	100,0	0,47
Negativo	54	25	-	59,2	
NPR3					
Positivo	3	2	24,3	33,3	0,26
Negativo	46	18	113,0	65,3	
KCNA1					
Positivo	6	2	65,1	60,0	0,95
Negativo	36	14	113,7	71,3	

* Teste de Log-Rank.

4.5 Correlação dos dados demográficos, histológicos e clínicos e da positividade para os marcadores com a sobrevida livre de doença

As tabelas 12, 13 e 14 demonstram as análises da sobrevida livre de doença em relação aos dados demógrafos, histológicos e clínicos e em relação às expressões imuno-histoquímicas dos marcadores considerados. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma dessas análises.

Tabela 12 - Análise de sobrevida livre de doença entre variáveis demográficas, histológicas e clínicas.

Sobrevida livre de doença					
Variável	Total de casos	Total de eventos	Tempo médio de sobrevida (meses)	Taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	Valor de <i>p</i> *
Faixa etária					
< 3 anos	1	0	-	100,0	0,23
3 - 16 anos	24	4	-	84,5	
>16 anos	16	6	-	65,8	
Gênero					
Feminino	12	3	88,7	75,0	0,92
Masculino	29	7	138,9	78,2	
Histologia					
Clássico	28	6	127,9	84,4	0,73
Desmoplásico	10	3	86,6	68,6	
A/GC	3	1	60,5	50,0	
Metástase					
Presente	1	0	-	100,0	0,61
Ausente	40	10	-	77,2	
Risco					
Alto	12	3	124,8	74,1	0,93
Padrão	29	7	123,8	79,1	

* Teste de Log-Rank. A/GC: tipo histológico anaplásico / grandes células

Tabela 13 - Análise de sobrevida global entre os marcadores p53, ciclinaD1, p16 e bcl2

Sobrevida livre de doença					
Variável	Total de casos	Total de eventos	Tempo médio de sobrevida (meses)	Taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos	Valor de <i>p</i> *
p53					
Positivo	3	0	-	100,0	0,46
Negativo	38	10	-	76,5	
Ciclina D1					
Positivo	4	0	-	100,0	0,39
Negativo	37	10	-	76,1	
p16					
Positivo	16	4	76,1	75,0	0,51
Negativo	25	6	136,3	79,0	
Bcl-2					
Positivo	3	1	72,2	50,0	0,92
Negativo	38	9	124,3	79,4	

* Teste de Log-Rank.

Tabela 14 - Análise de sobrevida livre de doença entre os marcadores representativos dos subgrupos de meduloblastoma com positividade exclusiva

Sobrevida livre de doença					
Variável	Total de casos	Total de eventos	Tempo médio de sobrevida (meses)	Taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos	Valor de p^*
β-catenina / DKK1					
Positivo	6	1	161,3	100,0	0,43
Negativo	24	5	131,2	77,7	
SFRP1					
Positivo	1	0	-	100,0	0,65
Negativo	35	8	-	81,6	
NPR3					
Positivo	2	1	22,9	50,0	0,11
Negativo	32	6	141,8	82,2	
KCNA1					
Positivo	5	1	52,5	75,0	0,51
Negativo	26	5	141,3	87,3	

* Teste de Log-Rank

4.6 Correlação da frequência de positividade dos marcadores DKK1 / β -catenina, SFRP1, NPR3, KCNA1 entre os subgrupos de meduloblastoma

Dos 61 casos analisados, apenas 22 foram positivos exclusivos para DKK1 / β -catenina (12 casos), SFRP1 (1 caso), NPR3 (3 casos) e KCNA1 (6 casos). Os casos foram distribuídos, respectivamente, entre os 4 subgrupos (WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4) conforme esses resultados positivos exclusivos. Desse modo, o subgrupo WNT constituiu-se no maior grupo, com 54,55% dos casos, seguido pelo Grupo 4 com 27,27% dos casos. O Grupo 3 foi composto por 13,64% dos casos e o SHH constituiu o menor subgrupo, com apenas 4,55% dos casos. (Gráfico 7)

Gráfico 7 - Proporção entre os subgrupos de meduloblastoma segundo a positividade exclusiva para os marcadores DKK1 / β -catenina (subgrupo WNT), SFRP1 (subgrupo SHH), NPR3 (Grupo 3), KCNA1 (Grupo 4)

Análises das frequências e correlações dos 4 subgrupos com dados demográficos, histológicos e presença de metástase ao diagnóstico estão demonstradas na tabela 15, bem como as análises de sobrevida global e de sobrevida livre de doença entre os subgrupos.

Tabela 15 - Correlação das frequências dos 4 subgrupos entre os dados demográficos, de histologia e de metástase ao diagnóstico (N (N%)) e análises de sobrevida global e livre de doença.

Subgrupos de meduloblastoma					
Variável	WNT (DKK1 / β- catenina exclusivos)	SHH (SFRP1 exclusivo)	Grupo 3 (NPR3 exclusivo)	Grupo 4 (KCNA1 exclusivo)	valor de <i>p</i>
Gênero					
Feminino	6 (66,7)	0	1 (11,1)	2 (22,2)	0,90*
Masculino	6 (46,2)	1 (7,7)	2 (15,4)	4 (30,8)	
Faixa etária					
< 3	0	0	0	0	0,32*
3 - 16	10 (62,5)	0	2 (12,5)	4 (25,0)	
> 16	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (33,3)	
Histologia					
Clássico	7 (53,8)	1 (7,7)	2 (15,4)	3 (23,1)	0,99*
Desmoplásico	4 (57,1)	0	1 (14,3)	2 (28,6)	
A/GC	1 (50,0)	0	0	1 (50,0)	
Metástase					
Presente	2 (50,0)	0	0	2 (50,0)	0,66*
Ausente	10 (55,6)	1 (5,6)	3 (16,7)	4 (22,2)	
Sobrevida global***	96,5 (27,7)	-	24,3 (10,1)	65,1 (12,8)	0,60**
Sobrevida livre de doença***	161,3 (22,6)	-	22,9 (14,4)	52,5 (12,6)	0,27**

* Teste exato de Fisher; ** Log-Rank; *** A variável foi descrita através de média (em meses) e erro padrão (SE).

Na análise de sobrevida global, os casos WNT tiveram a melhor sobrevida e viveram em média 96,5 meses, em comparação com 24,3 meses de sobrevida dos casos do Grupo 3, os quais apresentaram a pior sobrevida (Gráfico 8). O mesmo ocorreu em relação à sobrevida livre de doença (161,3 meses para os casos WNT em comparação com apenas 22,9 meses dos casos do Grupo 3). (Gráfico 9)

No entanto, esses dados não foram estatisticamente significativos.

Gráfico 8 - Análise da sobrevida global para os 4 subgrupos de meduloblastoma

Gráfico 9 - Análise da sobrevida livre de doença para os 4 subgrupos de meduloblastoma

A tabela 16 evidencia a frequência de positividade para os marcadores p53, ciclina D1, p16 e bcl-2 em cada um dos quatro subgrupos de meduloblastoma. A correlação entre positividade para cada um desses marcadores e os subgrupos específicos não apresentou significância estatística.

Tabela 16 - Frequência de positividade para os marcadores p53, ciclinaD1, p16 e bcl2 em cada um dos 4 subgrupos de meduloblastoma

Subgrupos de meduloblastoma					
Variável	WNT (DKK1 / β- catenina exclusivos)	SHH (SFRP1 exclusivo)	Grupo 3 (NPR3 exclusivo)	Grupo 4 (KCNA1 exclusivo)	valor de <i>p</i>
p53					
Positivo	4 (100,0)	0	0	0	0,36*
Negativo	8 (44,4)	1 (5,6)	3 (16,7)	6 (33,3)	
CiclinaD1					
Positivo	2 (100,0)	0	0	0	0,69*
Negativo	10 (50,0)	1 (5,0)	3 (15,0)	6 (30,0)	
p16					
Positivo	5 (55,6)	0	1 (11,1)	3 (33,3)	0,99*
Negativo	7 (53,8)	1 (7,7)	2 (15,4)	3 (23,1)	
Bcl2					
Positivo	4 (100,0)	0	0	0	0,36*
Negativo	8 (44,4)	1 (5,6)	3 (16,7)	6 (33,3)	

*Teste exato de Fisher

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização geral da casuística e dos resultados

O presente estudo analisou 61 casos de meduloblastoma, cuja incidência foi maior entre 3 e 16 anos de idade (34 casos), com pico entre 10 e 11 anos de idade. Entre os 61 casos, 62,3% ocorreram antes dos 16 anos de idade, conferindo com dados descritos anteriormente (Giangaspero et al., 2007).

A distribuição entre os gêneros masculino e feminino foi de cerca de 1,5:1, concordando com achados demográficos descritos previamente (Kool et al., 2008; Northcot et al., 2011). No entanto, entre os menores de 3 anos de idade, a relação foi de 3:1. Essa diferença não foi significativa quando comparada com a distribuição entre os gêneros nas outras faixas etárias e pode dever-se ao acaso, já que a casuística de pacientes menores de 3 anos contou apenas com 4 casos (6,6%).

Apesar de o gênero masculino ser o mais acometido pela doença, sua sobrevida global foi maior que a das mulheres ($p=0,03$), contrariamente ao que é descrito na literatura, que sugere sobrevida menor para o gênero masculino (Northcott et al., 2011).

Apesar de, a sobrevida global ser diferente nos dois gêneros, a sobrevida livre de doença é semelhante para ambos. Essa diferença na sobrevida global entre os gêneros, comparada com os resultados da literatura, pode dever-se a viés estatístico decorrente do pequeno tamanho da amostra.

Quanto ao tipo histológico, o clássico foi o mais frequente (67,2%), seguido pelo desmoplásico (24,6%) e A/GC (8,2%). Em comparação com a maioria dos estudos, as frequências dos tipos desmoplásico e A/GC foi discretamente maior, sendo descritas na literatura como 20% e 5%, respectivamente (Kim et al., 2011).

Alguns estudos descrevem que o tipo desmoplásico apresenta melhor prognóstico, e o A/GC, o pior dentre os três tipos histológicos (Rutkowski et al., 2010; Ellison et al., 2011; Silva et al., 2013). No presente estudo, os tumores clássicos apresentaram o maior tempo de sobrevida médio em meses (quase 110 meses) e os A/GC apresentaram o menor tempo (apenas 47,6 meses).

Embora essas diferenças sejam importantes, nenhum tipo histológico se mostrou como fator prognóstico e a ausência de significância estatística pode dever-se à amostra reduzida. Na faixa etária menor de 3 anos de idade, não houve nenhum caso de histologia A/GC, e os 4 casos dessa faixa etária se dividiram entre os tipos clássico e desmoplásico. Todos os 3 casos de tipo histológico com extensa nodularidade compreendiam crianças entre 2 e 6 anos de idade, corroborando as descrições prévias de que meduloblastoma dos tipos desmoplásico / nodular e com extensa nodularidade são mais comuns em lactentes e crianças mais novas (Ellison, 2010).

Apesar de 50% das crianças abaixo de 3 anos de idade apresentarem tumores desmoplásicos (descritos como de melhor prognóstico), a sobrevida global nessa faixa etária foi a pior de todas ($p=0,02$). Isso pode ser explicado pelo fato de que as crianças menores de 3 anos são classificadas como “alto risco” e esse grupo de risco apresenta prognóstico muito pior comparado ao de “risco padrão” ($p<0,01$), como visualizado na figura 15. Em crianças com

menos de 3 anos de idade, a imaturidade do sistema nervoso central é fator impeditivo para que recebam a mesma dose de radioterapia oferecida às crianças maiores, devido ao maior risco de sequelas neurológicas, endócrinas e psicossociais. Tomados em conjunto, os dados sugerem que o tratamento proposto para crianças com menos de 3 anos de idade pode ser desproporcional à agressividade da neoplasia, o que explicaria a menor sobrevida (Rutkowski et al., 2010).

Como esperado, a sobrevida global foi afetada pela presença de metástase no momento do diagnóstico, pois a sobrevida dos casos metastáticos foi significativamente menor do que a dos não portadores de metástases ($p=0,01$), conforme demonstrado na figura 14.

Aspecto interessante foi observado na expressão imuno-histoquímica de bcl2 em tumores desmoplásicos. Nas áreas nodulares (regiões bem diferenciadas e altamente apoptóticas), a marcação foi negativa para bcl2. O contrário foi visto nas áreas internodulares (regiões pouco diferenciadas e altamente proliferativas), nas quais a marcação foi positiva. Essa diferença na expressão de bcl2 entre as áreas nodulares e internodulares dos meduloblastomas desmoplásicos foi encontrada pelo grupo de Schüller e colaboradores (2004). Uma possível explicação para o fato encontra-se na própria função de bcl2 de inibir a apoptose celular. Portanto, é esperado que nos tumores desmoplásicos ele seja positivo apenas nas áreas internodulares. A mesma explicação justifica sua marcação difusa nos outros tipos histológicos.

Nenhum caso A/GC foi positivo para β -catenina, concordando com os outros estudos que descrevem a importância da via WNT nos tipos clássico e

desmoplásico, mas não no A/GC (Silva et al., 2013). Curiosamente, todos os casos positivos para β -catenina eram de tumores de pacientes do gênero feminino ($p=0,01$) – tabela 8. Como β -catenina é marcadora do subgrupo WNT, o qual apresenta relação quanto ao gênero descrita como de 1:1 (o que ocorreu também no presente estudo – tabela 15), a preponderância de positividade no gênero feminino para β -catenina não deve corresponder à realidade – provável viés devido à exiguidade de casos (apenas 4).

A positividade imuno-histoquímica forte e difusa para p53 é descrita como tendo boa correlação com a mutação do gene TP53; a mutação do gene TP53 relaciona-se com resistência às terapias convencionais para meduloblastoma – portanto, a mutação pode relacionar-se à recidiva (Tabori et al., 2010).

No presente estudo, esse fato não foi confirmado e, entre os 8 casos positivos para p53, nenhum apresentou recidiva (tabela 8). No entanto, houve uma importante relação entre a positividade para p53 e ciclina D1 e pacientes de alto risco ($p=0,05$). Nenhum outro marcador imuno-histoquímico apresentou relação significativa com dados demográficos, histológicos ou clínicos.

O tempo de sobrevida global médio, em meses, para os casos positivos para p53, ciclinaD1, bcl2 e NPR3 (marcadores descritos como relacionados ao pior prognóstico) foi menor do que o tempo de sobrevida para os casos negativos para esses marcadores.

Apesar dessas diferenças, nenhum marcador imuno-histoquímico apresentou significância prognóstica em meduloblastoma nas análises de sobrevida global e livre de doença nesta amostra (Tabelas 10, 11, 13 e 14), o que está de acordo com os dados da literatura. Apesar de todos os esforços de

diversos grupos na busca por marcadores de mau prognóstico, atualmente nenhum deles tem sido utilizado para melhorar a estratificação de risco dos pacientes com meduloblastoma, objetivando maior eficácia e menores riscos relacionados ao tratamento (Tabori et al., 2010).

Em parte, isso se deve à inconsistência entre os estudos e a questões tecnológicas divergentes. Há variação na marcação imuno-histoquímica dos anticorpos na literatura: índices de positividade apresentam grande oscilação entre os diversos estudos, ocasionando controvérsias sobre o real papel desses marcadores no meduloblastoma e insegurança quanto ao uso na rotina diagnóstica ou como auxiliares de valor prognóstico.

Exemplo dessa variação é a frequência de positividade para HER2 em meduloblastoma. A hiperexpressão do gene, detectado pela positividade imuno-histoquímica, tem sido associada ao pior prognóstico (de Haas et al., 2008; Kim et al., 2011). No entanto, tal associação é amplamente divergente na literatura e o índice de positividade para HER2 varia entre 90% (Das et al., 2009), passando a 18% de positividade forte e difusa (Tabori et al., 2010) e chegando a 0% (Entz-Werle et al., 2008). Em concordância com o estudo de Entz-Werle e colaboradores (2008), não encontramos nenhuma positividade para HER2 entre os 61 casos analisados.

Revisão recente de literatura, envolvendo 18 artigos que analisaram a expressão imuno-histoquímica de HER2 em meduloblastoma, concluiu que: 1) a hiperexpressão de HER2 raramente é encontrada em tumores intracranianos (incluindo meduloblastoma); 2) análises de hibridização *in situ* para determinar a amplificação do gene são supérfluas nesses tumores. Os autores também discutiram as divergências de resultados encontradas e concluíram que se

devem a diversos fatores que afetam a técnica imuno-histoquímica, tais como: a manipulação do tecido, a fixação, perda de expressão antigênica, método de recuperação antigênica, tipo de anticorpo (existem diversos anticorpos comercialmente disponíveis), diluição, tempo e temperatura de incubação, heterogeneidade tumoral, forma de avaliação da positividade e dificuldade de interpretação dos resultados (Waage et al., 2013). As mesmas discussões se aplicam para os demais anticorpos analisados, em que técnicas e formas de interpretação dos resultados variam amplamente na literatura, conforme previamente descrito na introdução deste estudo.

5.2 Caracterização dos subgrupos de meduloblastoma

O presente estudo se propôs a tentar definir 61 casos nos subgrupos moleculares de meduloblastoma através da frequência de positividade entre os marcadores DKK1 / β -catenina, SFRP1, NPR3, KCNA1. No entanto, essa amostra foi reduzida para apenas 22 casos, que foram positivos exclusivos para os anticorpos mencionados. Os casos positivos para 2 ou mais marcadores concomitantemente (exceto entre β -catenina e DKK1, marcadores do mesmo subgrupo) foram excluídos para que houvesse fidedignidade na classificação dos subgrupos.

Dos 22 casos, 12 foram classificados como pertencendo ao subgrupo WNT (54,55%), 1 caso como SHH (4,55%), 3 casos do Grupo 3 (13,64%) e 6 casos do Grupo 4 (27,27%). As frequências que encontramos entre os subgrupos são diferentes das descritas na literatura (Northcott et al., 2011; Kool et al., 2012; Taylor et al., 2012), o que pode ser explicada pela dificuldade

técnica encontrada na interpretação imuno-histoquímica dos casos analisados; é possível a existência de falsos positivos e negativos em todos os subgrupos. A mesma dificuldade interpretativa foi encontrada pelo grupo do Departamento de Neuropatologia da Universidade de Tuebingen, Alemanha.

Nós mantivemos contato com esse grupo por algum tempo a fim de tentarmos melhorar a padronização técnica; entretanto, apesar de inúmeras tentativas, esse grupo não conseguiu obter positividade confiável para SFRP1 e NPR3, nem mesmo nos controles testados. O grupo também testou o anticorpo GAB1, descrito como marcador do subgrupo SHH (tabela 1), mas obteve resultados insatisfatórios. Nós obtivemos positividade para todos os anticorpos somente após o uso de grande concentração dos anticorpos, principalmente para NPR3 (1:200) e para SFRP1 (1:35), concentrações estas diferentes das descritas no artigo original (Northcott et al., 2011), o que pode suscitar desconfiança quanto à positividade encontrada.

Nós contatamos os autores do artigo original via correspondência eletrônica, e eles admitiram a possibilidade de haver sobreposição de positividade entre os anticorpos marcadores dos Grupos 3 (NPR3) e 4 (KCNA1), e que NPR3 e SFRP1 podem apresentar marcação fraca de fundo, resultando em confusão diagnóstica. Eles também afirmaram que tinham excluído o anticorpo DKK1 de seu painel devido a sua inespecificidade. Também substituíram o anticorpo NPR3, advindo da fornecedora Abcam® - ab37617-100 (diluição 1:200), pelo da Sigma® - HPA031065 (diluição 1:30). Excluindo-se os casos positivos para DKK1 e se considerados apenas os tumores com positividade exclusiva para β -catenina (4 casos) para determinar o subgrupo WNT, este apresentaria porcentagem de 18,2%, o que seria uma

porcentagem ainda mais elevada do que a previamente descrita na metanálise de 2012 (11% de casos do subgrupo WNT); mas seria o subgrupo menos numeroso dos 4, como esperado (Kool et al., 2012).

Ainda utilizando apenas a positividade para β -catenina, o Grupo 4 seria o subgrupo mais numeroso, com 27,27% dos casos, conforme descrito na literatura, apesar da porcentagem ser pouco menor do que a esperada (34% de casos do Grupo 4).

As frequências de 4,55%, encontrada no subgrupo SHH (em vez de 28%, como descrito), e de 13,64%, encontrada no Grupo 3 (em vez de 27%), também podem ser explicadas pela dificuldade técnica na avaliação do resultado imuno-histoquímico para SFRP1 e NPR3, respectivamente. Apenas 5 casos foram positivos para SFRP1 e somente 1 caso apresentou positividade exclusiva, o que provavelmente se deve à positividade difusa e fraca encontrada na maioria dos casos, dificultando a interpretação a respeito da fidelidade dessa positividade.

Quanto ao anticorpo NPR3, a maior dificuldade se deveu à especificidade, pois, dos 14 casos que foram positivos, apenas 3 foram exclusivos, diminuindo a quantidade de casos que poderiam também pertencer a esse subgrupo.

Mesmo no caso do anticorpo β -catenina, comumente usado na rotina diagnóstica de outras doenças, sua expressão nos meduloblastomas é frequentemente positiva no citoplasma das células tumorais, dificultando a análise dos tumores com expressão positiva nuclear, que são os que verdadeiramente apresentam mutação da via WNT.

Apesar da divergência entre os nossos resultados e os da literatura quanto às frequências entre os subgrupos, as outras variáveis e os prognósticos descritos para cada subgrupo mostraram-se bastante semelhantes. (Tabela 17)

Tumores do Grupo 3 apresentam significativa redução de sobrevida, independentemente da presença ou não de metástase (Northcott et al., 2011; Kool et al., 2012), pois, apesar dos três únicos casos pertencentes ao Grupo 3 não apresentarem metástase ao diagnóstico, eles obtiveram menor sobrevida em meses, em comparação aos outros subgrupos. Segundo o estudo de metanálise, fatores como histologia e presença de metástase ao diagnóstico, que têm importância prognóstica dentro da doença meduloblastoma como um todo, são raramente fatores prognósticos dentro dos subgrupos, e muitas vezes não se sustentam em análises multivariadas (Kool et al., 2012).

No presente estudo, a histologia não teve papel prognóstico, diferentemente da presença de metástase ao diagnóstico, a qual se mostrou fator de pior prognóstico. No entanto, não foi possível fazer análise multivariada devido ao tamanho da amostra. Como meduloblastoma é uma doença relativamente rara, casuística de 61 casos de apenas uma instituição é significativa, porém, insuficiente para determinadas análises estatísticas, destacando-se a necessidade de estudos multicêntricos.

O prognóstico descrito na tabela 17 foi avaliado com base nas diferenças entre o tempo médio de sobrevida em meses para cada subgrupo, tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre de doença (dados demonstrados na tabela 15), apesar dessas diferenças não terem sido estatisticamente significativas.

Tabela 17 - Análise comparativa entre os resultados do presente estudo e os descritos na literatura para cada subgrupo de meduloblastoma

	Dados desse estudo	Dados da literatura*
Frequencia		
WNT	54,55%	11,00%
SHH	4,55%	28,00%
Grupo 3	13,64%	27,00%
Grupo 4	27,27%	34,00%
Gênero (M:F)		
WNT	1:1	1:1
SHH	não avaliável	1:1
Grupo 3	2:1	2:1
Grupo 4	2:1	2:1
Faixa etária		
WNT	maioria 3 - 16 (nenhum < 3)	maioria 3 -16 (incomum em < 3)
SHH	> 16 (único caso)	maioria < 3 ou > 16
Grupo 3	maioria 3 - 16	< 3 e 3 - 16
Grupo 4	maioria 3 - 16	maioria 3 - 16
Histologia		
WNT	maioria clássico	maioria clássico
SHH	clássico (único caso)	Clássico, Desmopl., A/GC
Grupo 3	maioria clássico	Clássico, A/GC
Grupo 4	maioria clássico	Clássico, A/GC
Metástase		
WNT	16,6%	raro
SHH	único caso não metastático	incomum
Grupo 3	3 casos não metastáticos	muito frequente
Grupo 4	33,3%	frequente
Prognóstico		
WNT	melhor	melhor
SHH	não avaliável	intermediário
Grupo 3	pior	pior
Grupo 4	intermediário	intermediário

* Kool et al., 2012; Taylor et al., 2012

Apesar das semelhanças demonstradas entre as características dos subgrupos nesses 22 casos e nos subgrupos descritos na literatura, 39 casos

não puderam ser avaliados, pois foram negativos para todos os marcadores, ou positivos não exclusivos. Esse fato demonstra a baixa sensibilidade e especificidade desses marcadores, além das dificuldades técnicas na interpretação dos resultados, o que causa insegurança para o uso na rotina. Os mesmo achados foram demonstrados em outro estudo, que descreveu positividade não exclusiva para os mesmos marcadores e mencionou a insensibilidade de NPR3 para classificar o Grupo 3 e a inespecificidade de KCNA1 em definir o Grupo 4 (Min et al., 2013).

Portanto, mesmo que a divisão em subgrupos de meduloblastomas seja o melhor fator prognóstico, há necessidade de identificar melhores marcadores para cada subgrupo, de modo que eles sejam facilmente identificados (Kool et al., 2012). Ultimamente, diversas moléculas passíveis de serem utilizadas como terapia-alvo estão surgindo. Exemplo disso é a *smoothened* (SMO), que têm demonstrado alta efetividade contra meduloblastomas SHH (Taylor et al., 2012). Assim sendo, há necessidade do desenvolvimento de marcadores práticos para a rotina diagnóstica e eficazes para a identificação dos subgrupos.

Outro possível marcador subgrupo-específico recentemente identificado é a proteína FSTL5. É descrito que imunopositividade para essa proteína pode identificar grande grupo de pacientes de alto risco, dentro de todos os casos de meduloblastoma, mais especificamente dentro dos Grupos 3 e 4 (Remke et al., 2011; Kool et al., 2012).

Recentemente, foi desenvolvido um teste chamado *nanoString nCounter Technology*, que pode ser utilizado para separar os tumores nos subgrupos específicos de acordo com o nível de expressão de 22 genes (*CodeSet*). Os

autores descrevem-no como econômico, acurado e rápido, além da vantagem adicional de poder ser usado em blocos de parafina (Northcott et al., 2012). No entanto, precisa ser testado e validado por outros centros e, até o presente, o método mais confiável para classificar os meduloblastomas nos quatro subgrupos ainda não foi definido (Kool et al., 2012).

A positividade imuno-histoquímica para os anticorpos p53, ciclina D1, p16 e bcl2 foi correlacionada com cada subgrupo a fim de encontrar outro marcador, ainda não pesquisado (tabela 16). O fato de todos os casos positivos para os marcadores p53, ciclina D1 e bcl2 pertencerem ao subgrupo WNT, não apresentou significado estatístico, não sendo possível afirmar que esses marcadores podem auxiliar na classificação de tumores desse subgrupo

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

➤ O presente estudo determinou a imunoexpressão de dez proteínas em 61 casos de meduloblastoma. As frequências de positividade para DKK1, SFRP1, NPR3 e KCNA1 foram divergentes das descritas na literatura, havendo grande dificuldade na técnica imuno-histoquímica para esses anticorpos e na interpretação dos resultados obtidos. As frequências de positividade para β -catenina, ciclinaD1, p16, p53, bcl-2 e HER2 respectivamente, foram semelhantes às encontradas em alguns estudos e diferentes em relação a outros.

➤ A correlação da expressão imuno-histoquímica para cada anticorpo com gênero, faixa etária no diagnóstico, tipo histológico, presença de metástase no diagnóstico, recidiva e grupos de risco, não revelou associação estatisticamente significativa, exceto β -catenina, que foi associada com sexo feminino, associação não explicável biologicamente, devendo corresponder a viés devido ao pequeno tamanho amostral.

➤ A correlação entre os dados demográficos, histológicos e clínicos com a sobrevida global revelou associação estatisticamente significativa entre idade menor de 3 anos, sexo feminino, presença de metástase no diagnóstico e grupo de alto risco com pior sobrevida. Não houve associação entre os mesmos dados e a sobrevida livre de doença. Os resultados da expressão imuno-histoquímica para cada anticorpo, associados com a sobrevida global e a sobrevida livre de doença, revelaram que nenhum dos 10 marcadores imuno-histoquímicos analisados se mostrou estatisticamente significativo como fator prognóstico.

➤ A classificação dos tumores nos quatro subgrupos de meduloblastoma foi realizada através da frequência de positividade para os marcadores β -catenina e DKK1 (subgrupo WNT), SFRP1 (subgrupo SHH), NPR3 (Grupo 3), KCNA1 (Grupo 4). Os marcadores revelaram baixa sensibilidade e especificidade em determinar os subgrupos, havendo casos negativos para todos esses marcadores e positivos para mais de um marcador. Entretanto, foi possível classificar 22 casos, considerando-se apenas a positividade exclusiva para cada um desses marcadores. Análise entre a classificação e as respectivas variáveis demográficas, histológicas, clínicas e prognósticas foi semelhante à encontrada em metanálise e em estudos de consenso sobre o assunto, apesar de as frequências dos subgrupos serem diferentes das descritas.

7 ANEXOS

Anexo A. Carta de aprovação da Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa da USP – CAPPesq

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 09/06/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0317/10, intitulado: **"ANÁLISE PROTÉICA DAS VIAS NOTCH, SONIC HEDGEHOG E DA ANGIOGÊNESE NOS MEDULOBLASTOMAS: CORRELAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

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: **Prof. Dr. Sergio Rosenberg**

Pesquisador (a) Executante: **Gisele Caravina Santos**

CAPPesq, 10 de Junho de 2010

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

Anexo B. Carta de aprovação da CAPPesq ao adendo do projeto de pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0317/10

Título: ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS DOS SUBGRUPOS MOLECULARES DOS MEDULOBLASTOMAS E ASSOCIAÇÕES COM POSSÍVEIS FATORES PROGNÓSTICOS

Pesquisador Responsável: Sergio Rosenberg

Pesquisador Executante: Giselle Caravina de Almeida

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: PATOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 07/11/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 27/09/12 - Adendo ao projeto; mudança de título de: Análise proteômica das vias Notch, Sonic Hedgehog e da angiogênese nos meduloblastomas; correlação clínico-patológica, para: Análise das frequências dos subgrupos moleculares dos meduloblastomas e associações com possíveis fatores prognósticos.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 07 de Novembro de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo C. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital de Câncer de Barretos

**Comitê de Ética em Pesquisa
CEP**

Para: Dra Gisele Caravina Santos

De: Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 12/11/2009

Projeto de Pesquisa: 270/2009

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos analisou em reunião ordinária de 12/11/2009 o projeto de pesquisa 270/2009 : **"Análise proteica das vias Notch, Sonic Hedgehog e da angiogênese nos meduloblastomas: correlação clínico-patológica,** decidindo que o mesmo encontra-se

"Aprovado"

Solicitamos, que sejam encaminhados ao CEP, relatórios semestrais e final, bem como possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo a fim de se fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital de Câncer de Barretos

Anexo D. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos ao adendo do projeto de pesquisa

**Comitê de Ética em Pesquisa
CEP**

Para: Gisele Caravina de Almeida

De: Sergio Vicente Serrano
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 25/09/2012

Projeto de Pesquisa: 270/2009

Prezado (a) Senhor (a),

Venho, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos analisou os seguintes documentos do projeto 270/2009 “Análise das frequências dos subgrupos moleculares dos meduloblastomas e associações com possíveis fatores prognósticos”, e:

- Está Ciente do Adendo feito ao projeto com a mudança do título do Estudo Supracitado, submetido em 24/09/2012;
- Está ciente das inserções de outras reações imuno-histoquímicas ao Estudo Supracitado, submetido em 24/09/2012;
- Está ciente do Relatório Parcial do Estudo Supracitado, submetido em 24/09/2012;

Atenciosamente,

Sergio Vicente Serrano
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Caligur V. The cancer stem cell hypothesis. Biofiles, [Internet]. 2008 [citado 2014 abr 13]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/the-cancer-stem-cell.html>.

Chène P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(2):102-9.

Chinese Journal of Cancer, v.30, n.7, [Internet]. 2011 [citado 2014 abr 13]; Available from: <http://www.cjcsysu.cn/aboutthecover.asp?issue=201107>.

Das P, Puri T, Suri V, Sharma MC, Sharma BS, Sarkar C. Medulloblastomas: a correlative study of MIB-1 proliferation index along with expression of c-Myc, ERBB2, and anti-apoptotic proteins along with histological typing and clinical outcome. *Childs Nerv Syst*. 2009;25(7):825-35.

de Haas T, Hasselt N, Troost D, Caron H, Popovic M, Zdravcevic-Zaletel L. et al. Molecular risk stratification of medulloblastoma patients based on immunohistochemical analysis of MYC, LDHB, and CCNB1 expression. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4154-60.

Ellison DW. Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathol*. 2010;120(3):305-16.

Ellison DW, Kocak M, Dalton J, Megahed H, Lusher ME, Ryan SL. et al. Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *J Clin Oncol*. 2011; 29(11):1400-7.

Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, Lusher ME, Weston CL, Taylor RE, et al. beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood

medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *J Clin Oncol*. 2005;23(31):7951-7.

Entz-Werle N, Velasco V, Neuville A, Geoerger B, Mathieu MC, Guerin E, et al. Do medulloblastoma tumors meet the Food and Drug Administration criteria for anti-erbB2 therapy with trastuzumab? *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50(1):163-6.

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

Fattet S, Haberler C, Legoix P, Varlet P, Lellouch-Tubiana A, Lair S, et al. Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. *J Pathol*. 2009;218(1):86-94.

Fu ZJ, Ma ZY, Wang QR, Lei DP, Wang R, Liu CX, Pan XL. Overexpression of CyclinD1 and underexpression of p16 correlate with lymph node metastases in laryngeal squamous cell carcinoma in Chinese patients. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(8):887-92.

Gajjar A, Hernan R, Kocak M, Fuller C, Lee Y, McKinnon PJ, et al. Clinical, histopathologic, and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma. *J Clin Oncol*. 2004;22(6):984-93.

Giangaspero F, Eberhart CG, Haapasalo H, Pietsch T, Wiestler OD, Ellison DW. Medulloblastoma. In: Louis DN., et al. WHO classification of tumours of the central nervous system. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2007. p. 132-140.

Gilbertson R, Wickramasinghe C, Hernan R, Balaji V, Hunt D, Jones-Wallace D, et al. Clinical and molecular stratification of disease risk in stratification of disease risk in medulloblastoma. *Br J Cancer*. 2001;85(5): 705-12.

Gilbertson RJ, Pearson AD, Perry RH, Jaros E, Kelly PJ. Prognostic significance of the c-erbB-2 oncogene product in childhood medulloblastoma. *Br J Cancer*. 1995;71(3):473-7.

Gottardo NG, Hansford JR, McGlade JP, Alvaro F, Ashley DM, Bailey S, et al. Medulloblastoma Down Under 2013: a report from the third annual meeting of the International Medulloblastoma Working Group. *Acta Neuropathol*. 2014;127(2):189-201.

Kim W, Choy W, Dye J, Nagasawa D, Safaee M, Fong B, Yang I. The tumor biology and molecular characteristics of medulloblastoma identifying prognostic factors associated with survival outcomes and prognosis. *J Clin Neurosci*. 2011;18(7):886-90.

Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):473-84

Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One*. 2008;3(8):e3088.

Korshunov A, Remke M, Werft W, Benner A, Ryzhova M, Witt H, et al. Adult and pediatric medulloblastomas are genetically distinct and require different algorithms for molecular risk stratification. *J Clin Oncol*. 2010;28(18):3054-60.

Krecicki T, Smigiel R, Fraczek M, Kowalczyk M, Sasiadek MM. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue. *J Laryngol Otol*. 2004;118(9):676-80.

Lange CA, Yee D. Killing the second messenger: targeting loss of cell cycle control in endocrine-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(4):C19-24.

Min HS, Lee JY, Kim SK, Park SH. Genetic grouping of medulloblastomas by representative markers in pathologic diagnosis. *Transl Oncol*. 2013;6(3):265-72.

Moschovi M, Koulouki E, Stefanaki K, Sfakianos G, Tourkantonis N, Prodromou N, Alexiou GA Prognostic Significance of Angiogenesis in Relation to Ki-67, p-53, p-27, and bcl-2 Expression in Embryonal Tumors. *Pediatr Neurosurg*. 2011;47(4):241-7.

Neben K, Korshunov A, Benner A, Wrobel G, Hahn M, Kokocinski F, et al. Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival. *Cancer Res*. 2004;64(9):3103-11.

Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1408-14.

Northcott PA, Shih DJ, Remke M, Cho YJ, Kool M, Hawkins C, et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):615-26.

Ongürü O, Karslioglu Y, Ozcan A, Celik E. Anti-apoptotic and growth-promoting markers in adult medulloblastomas. *Clin Neuropathol*. 2010;29(6):384-9.

Perik PJ, de Korte MA, van Veldhuisen DJ, Gietema JA, Sleijfer DT, de Vries EG. Cardiotoxicity associated with the use of trastuzumab in breast cancer patients. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007;7(12):1763-71.

Pfaff E, Remke M, Sturm D, Benner A, Witt H, Milde T , et al. TP53 mutation is frequently associated with CTNNB1 mutation or MYCN amplification and is compatible with long-term survival in medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 2010;28(35):5188-96.

Polkinghorn WR, Tarbell NJ. Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007;4(5):295-3.

Ray A, Ho M, Ma J, Parkes RK, Mainprize TG, Ueda S, McLaughlin J, et al. A clinicobiological model predicting survival in medulloblastoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7613-20.

Raabe E, Eberhart CG. Therapeutic targeting of developmental signaling pathways in medulloblastoma: Hedgehog, Notch, Wnt and Myc. *Current Signal Transduction Therapy.* 2013; 8(1):55-66.

Remke M, Hielscher T, Korshunov A, Northcott PA, Bender S, Kool M, et al. FSTL5 is a marker of poor prognosis in non-WNT/non-SHH medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(29):3852-61.

Remke M, Hielscher T, Northcott PA, Witt H, Ryzhova M, Wittmann A, et al. Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants. *J Clin Oncol.* 2011;29(19):2717-23.

Rutkowski S, von Bueren A, von Hoff K, Hartmann W, Shalaby T, Deinlein F, et al. Prognostic relevance of clinical and biological risk factors in childhood medulloblastoma: results of patients treated in the prospective multicenter trial HIT'91. *Clin Cancer Res.* 2007;13(9):2651-7.

Rutkowski S, von Hoff K, Emser A, Zwiener I, Pietsch T, Figarella-Branger D, et al. Survival and prognostic factors of early childhood medulloblastoma: an international meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2010;28(33):4961-8.

Saab R, Rodriguez-Galindo C, Matmati K, Rehg JE, Baumer SH, Khoury JD, et al. p18Ink4c and p53 Act as tumor suppressors in cyclin D1-driven primitive neuroectodermal tumor. *Cancer Res*. 2009;69(2):440-8.

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;59(1):49-61.

Schüller U, Schober F, Kretschmar HA, Herms J. Bcl-2 expression inversely correlates with tumour cell differentiation in medulloblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004;30(5):513-21.

Silva Rd, Marie SK, Uno M, Matsushita H, Wakamatsu A, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM. CTNNB1, AXIN1 and APC expression analysis of different medulloblastoma variants. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(2):167-72.

Srikantha U, Balasubramaniam A, Santosh V, Somanna S, Bhagavatula ID, Ashwathnarayana CB. Recurrence in medulloblastoma - influence of clinical, histological and immunohistochemical factor. *Br J Neurosurg*. 2010;24(3):280-8.

Tabori U, Baskin B, Shago M, Alon N, Taylor MD, Ray PN, Bouffet E, et al. Universal poor survival in children with medulloblastoma harboring somatic TP53 mutations. *J Clin Oncol*. 2010;28(8):1345-50.

Taylor MD, Mainprize TG, Rutka JT. Molecular insight into medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor biology from hereditary syndromes: a review. *Neurosurgery*. 2000;47(4):888-901.

Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):465-72.

Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, et al. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol.* 2006;24(12):1924-31.

Waage IS, Vreim I, Torp SH. C-erbB2/HER2 in human gliomas, medulloblastomas, and meningiomas: a minireview. *Int J Surg Pathol.* 2013;21(6):573-82.

Zhao X, Song T, He Z, Tang L, Zhu Y. A novel role of cyclinD1 and p16 in clinical pathology and prognosis of childhood medulloblastoma. *Med Oncol.* 2010;27(3):985-91.