

# Sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado que expresan el antígeno Ki67, atendidos en un hospital de pediatría

Enrique López-Aguilar,<sup>a\*</sup> Ana Carolina Sepúlveda Vildósola,<sup>b</sup> Ana Paulina Rioscovián-Soto,<sup>b</sup> Graciela Gascón-Lastiri,<sup>a</sup> Federico Rojas-Puentes,<sup>a</sup> Georgina Siordia-Reyes,<sup>c</sup> Jaime Diegopérez-Ramírez,<sup>d</sup> Hermilo De la Cruz-Yáñez<sup>d</sup> y Carolina Barrientos-Salcedo<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Departamentos de Oncología Pediátrica, <sup>b</sup>Pediatría Médica, <sup>c</sup>Anatomía Patológica, <sup>d</sup>Neurocirugía Pediátrica y <sup>e</sup>Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 4 de diciembre de 2009

Aceptado: 9 de abril de 2010

## RESUMEN

**Antecedentes:** Los pacientes pediátricos con astrocitomas de alto grado con mismas histologías presentan respuestas diferentes a idéntico tratamiento. Es necesario identificar los factores que influyen en el pronóstico y respuesta al mismo. La sobreexpresión de la proteína Ki67 se ha asociado con respuestas poco favorables. El objetivo fue determinar si la expresión de este antígeno influye en la sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

**Métodos:** Se incluyeron pacientes con astrocitoma anaplásico o glioblastoma multiforme atendidos entre 1995 y 2005. Por inmunohistoquímica se determinó la expresión del antígeno Ki67 en las muestras de tejido tumoral y se correlacionó con la histología tumoral y la sobrevida de los pacientes.

**Resultados:** De 21 pacientes, 12 sobreexpresaron el antígeno Ki67. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión del antígeno Ki67 y la sobrevida, aunque sí clínica. Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión del Ag Ki67 y el grado de malignidad del tumor. La edad menor de 11 años resultó un factor de mal pronóstico. La sobrevida global fue de 49% a 120 meses.

**Conclusiones:** La edad menor de 11 años fue un factor de mal pronóstico en los pacientes estudiados con astrocitoma o glioblastoma multiforme. La sobreexpresión del antígeno Ki67 está asociada con la histología y pareciera tener relación con la sobrevida de los pacientes pediátricos con astrocitoma.

## Palabras clave:

Ki67, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, cáncer pediátrico

## SUMMARY

**Background:** Pediatric patients with malignant gliomas and same histological diagnosis respond distinctly to treatment. It is thus necessary to determine other factors that may influence the response to treatment and survival. Over expression of the Ki67 protein has been associated with poor treatment response. The aim of this study was to determine if the expression of this antigen influences survival of patients treated for malignant gliomas in the CMN SXXI Pediatrics Hospital.

**Methods:** We included patients with anaplastic astrocytoma or glioblastoma multiforme seen at our hospital between 1995 and 2005. We determined the expression of Ki67 by immunohistochemistry and correlated the findings with tumor histology and patient survival.

**Results:** Of the 21 patients studied, 12 over expressed antigen Ki67. There was no significant association between over expression of Ki67 and survival, although we observed a clinical association. Over expression of Ki67 correlated with more aggressive histology. Being under the age of 11 was a poor prognostic factor. Overall survival was 49% at 120 months.

**Conclusions:** Being young (under 11 years) is a marker of poor prognosis among pediatric patients with anaplastic astrocytoma or glioblastoma multiforme. Overexpression expression of antigen Ki67 is associated with histology and may be associated with poor survival among patients treated in our hospital.

## Key words:

Ki67, malignant astrocytoma, glioblastoma pediatric cancer

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Enrique López-Aguilar. Departamento de Oncología Pediátrica, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, 06725 México D.F., México. Tel.: (55) 5627 6900, extensión 22500. Correo electrónico: elopezaguilar@hotmail.com

## Introducción

Los tumores cerebrales representan el tipo de tumor sólido más frecuente en la edad pediátrica, son los segundos en frecuencia general después del grupo formado por las leucemias y los linfomas.<sup>1</sup> La incidencia mundial anual se encuentra entre 10 y 18 casos por millón, la presentación más frecuente es en hombres, raza blanca y menores de cinco años.<sup>2</sup> En estudios en población de la ciudad de México se ha encontrado una incidencia anual de 17 casos por millón, es decir, 560 casos de tumores del sistema nervioso central por año.<sup>3</sup>

Los tumores cerebrales más frecuentes son los que se derivan de la glia, hasta 60 %, siendo los astrocitomas los más comunes. Más de los dos tercios partes de estos tumores tienen su origen en los hemisferios cerebrales, el resto puede generarse en las estructuras diencefálicas o en el cerebelo.<sup>4</sup> La clasificación histológica de Kernohan los separa en cuatro grados, siendo de alta malignidad los de grado III (astrocitomas anaplásicos) y los de grado IV (glioblastoma multiforme).

El diagnóstico clínico se sospecha por cefalea y vómito (cíclico o matutino) secundario a incremento de la presión intracraneana o a irritación del núcleo vagal o centro del vómito en el cuarto ventrículo, e incremento del perímetro cefálico en lactantes.<sup>5,6</sup> Otros síntomas son edema de papila en los tumores localizados en cerebelo, cambios en el afecto, así como en los niveles de energía y motivación. El síndrome central se presenta cuando se involucran ambos hemisferios o el diencefalo. Es característica de estos pacientes, las respuestas oculomotoras, oculocefálicas y oculoestibulares. La pérdida de balance en la función del tronco cerebral (como alteraciones en la coordinación de las extremidades superiores y afección a pares craneales) sugiere tumoración infratentorial. La afección a pares craneales, especialmente VI, VII y IX, sugieren la posibilidad de una tumoración del tallo cerebral.<sup>7</sup>

En la actualidad se tienen disponibles técnicas imagenológicas funcionales (espectroscopia magnética, estudios de perfusión para determinar angiogénesis y de permeabilidad vascular y de difusión molecular, entre otros) para el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes.<sup>8,9</sup>

El diagnóstico histopatológico se obtiene por estudio de microscopía de luz e inmunohistoquímica del espécimen obtenido por biopsia o por resección total o subtotal. En las tumoraciones en tallo cerebral donde el acceso quirúrgico es difícil, la biopsia se obtiene por esterotaxia.<sup>10</sup>

El tratamiento del tumor se basa en la neurocirugía, cuyos objetivos son el diagnóstico histopatológico, reducir el efecto de masa de la tumoración que ocasiona obstrucción, mejorar la circulación del líquido cefalorraquídeo y lograr la mayor resección tumoral posible, lo cual tiene significado pronóstico,<sup>11,12</sup> seguido de quimioterapia prerradioterapia con diferentes esquemas para lograr mayor reducción tumoral y la radiosensibilización del tumor (se ha logrado 54 % de reducción tumoral con esquema VETOPEC<sup>13</sup> y 75 % para astrocitomas y 24 % para glioblastomas con ifosfamida-carboplatino-etopósido<sup>14</sup>). Por último, se utiliza radioterapia

al tumor residual con 54 a 56 Gy,<sup>15</sup> excepto en pacientes menores de tres años.

La expectativa de vida actual para estos pacientes es de 56 % a cinco años<sup>14</sup> y depende de varios factores tales como la histología (anaplasia y glioblastoma multiforme), la localización (en tallo cerebral),<sup>16</sup> los factores de crecimiento celular (sobrexpresión de factores de crecimiento),<sup>17,18</sup> el índice mitótico<sup>19,20</sup> y la expresión de los antígenos de proliferación, como el Ki67,<sup>21</sup> entre otros.

El antígeno Ki67 es una proteína nuclear no histona que se expresa en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), excepto en G0. Es una proteína nuclear de gran tamaño con numerosos dominios repetidos que interviene en el mantenimiento del ciclo celular. Es considerado un marcador de la proliferación de células neoplásicas.<sup>22</sup> Su detección se realiza por inmunohistoquímica.<sup>23</sup>

La expresión de Ki67 se correlaciona bien con el grado y estadio tumoral. Diversos estudios han mostrando que la expresión de Ki67 es un marcador pronóstico independiente de recidiva y progresión.<sup>24</sup> Heergaard<sup>25</sup> encontró que los pacientes que expresaban el antígeno Ki67 en más de 3 % de sus células tumorales y PCNA mayor de 4 %, tenían una supervivencia media de 23.5 y 26.5 meses, respectivamente, mientras que la supervivencia media general era de 4.4 años.

La determinación de Ki67 permite diferenciar grupos de mayor agresividad, que justificaría en ellos una terapia más agresiva que la que le correspondería por sus características de estadio y grado.<sup>26</sup>

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la expresión del antígeno Ki67 como factor pronóstico independiente en la sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado.

## Métodos

El presente estudio se realizó en el Hospital De Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, durante 2008, analizando los expedientes de los pacientes diagnosticados con astrocitoma anaplásico o glioblastoma multiforme entre 1995 y 2005. El protocolo fue aprobado por el comité local de investigación (R-2008-3603-26). Se incluyó a todos los pacientes menores de 15 años con diagnóstico de astrocitoma de alto grado establecido en el Servicio de Patología del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, que contaban con expediente completo y muestra del tumor en bloque de parafina, y que hubieran completado un seguimiento de por lo menos dos años. Todos los pacientes recibieron tratamiento por el Servicio de Oncología del Hospital, con el protocolo ICE (carboplatino 400 mg/m<sup>2</sup>/día en día 1, seguido de ifosfamida 2 g/m<sup>2</sup> días 1, 2 y 3, y etopósido 100mg/m<sup>2</sup>/día días 1, 2 y 3, cada tres días por cuatro cursos), seguido de radioterapia (5400 Gy). Se eliminaron los pacientes que abandonaron el tratamiento o cuyas muestras no pudieron ser procesadas por ser insuficientes.

Se tomaron de los expedientes los siguientes datos: edad al diagnóstico, sexo, diagnóstico histopatológico, localización

de la tumoración, tipo de cirugía, volumen tumoral residual, fecha de diagnóstico y fecha de defunción o última cita.

Las muestras de parafina fueron procesadas por inmunohistoquímica estreptavidina-biotina, usando como anticuerpo primario al anticuerpo monoclonal PP-67 a dilución 1:200.<sup>27</sup> Las muestras se incubaron 24 horas en cámara húmeda y posteriormente se revelaron.

Para determinar el patrón de expresión de Ki67, un médico patólogo ciego a la sobrevida de los pacientes realizó cuenta celular abarcando aproximadamente 1000 células (15 campos microscópicos). Se consideró una reacción positiva cuando la célula mostró un núcleo intensamente teñido de marrón y para la distribución de éstas se utilizó una escala semicuantitativa:

- Mínima: menos de 10 % de células positivas.
- Moderada: entre 10 y 50 % de células positivas.
- Alta: más de 50 % de células positivas.

El análisis estadístico se llevó a cabo con medidas de tendencia central y dispersión, de acuerdo con la distribución de las variables. Se analizó la asociación de cada variable con la probabilidad de morir mediante prueba de  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher y se calculó riesgo mediante razón de momios. La sobrevida global y libre de enfermedad se estimó a uno, cinco y 10 años, de acuerdo con el método actuarial, con prueba Wilcoxon-Gehan para determinar diferencias entre grupos.

## Resultados

Se incluyeron 21 pacientes, de los cuales 10 fueron mujeres (47.6 %), con una relación hombre mujer de 1.1:1. La media de edad fue de 10.52 años (DE  $\pm$  3.945) y 33.3 % de los pacientes tuvo entre 12 y 13 años. El 76.2 % de las tumoraciones se encontró en la región supratentorial en algún hemisferio cerebral y fue sometido a cirugía con resección subtotal, 19 % en tallo cerebral, sometido solo a biopsia, y 4.8 % en cerebelo con cirugías totales. El 52.4 % correspondió a astrocitoma anaplásico y 47.6 % fue glioblastoma multiforme. Un poco más de la mitad (57.1 %) de las tumoraciones expresó el antígeno Ki67. Al momento de este informe, siete pacientes se encontraban vivos, cinco se perdieron al seguimiento y nueve habían fallecido (Cuadro I).

La sobreexpresión del antígeno Ki67 no se asoció significativamente con la sobrevida de los pacientes (prueba exacta de Fisher  $p = 0.319$ , OR = 1.35, IC 95 % = 0.691-2.637), sin embargo, llama la atención que 75 % de los que sí la expresaron hubieran fallecido, mientras que solo 55.5 % de quienes no lo hicieron fallecieron. Existe una asociación estadísticamente significativa (prueba exacta de Fisher  $p = 0.006$ ) entre la sobreexpresión del antígeno Ki67 y la histología del tumor. El riesgo de presentar una histología de glioblastoma multiforme al sobreexpresar al antígeno Ki67 fue de 6.75 (IC 95 % = 1.03-44.08).

**Cuadro I. Características de los pacientes**

Sexo	Edad	Localización	Histología	Meses de sobrevida	Ki67	Estado actual
F	13	Supratentorial	GM	60	Neg	Vivo
M	9	Supratentorial	GM	22	Pos	Falleció
F	12	Supratentorial	GM	144	Pos	Vivo
M	12	Tallo cerebral	GM	8	Pos	Falleció
F	5	Supratentorial	GM	126	Pos	Falleció
F	17	Supratentorial	GM	115	Pos	Vivo
M	13	Supratentorial	GM	99	Pos	Vivo
M	8	Supratentorial	AA	27	Neg	Pérdida al seguimiento
M	8	Tallo cerebral	AA	12	Neg	Falleció
F	4	Supratentorial	AA	94	Pos	Falleció
F	13	Tallo cerebral	AA	25	Neg	Pérdida al seguimiento
M	10	Supratentorial	AA	10	Pos	Falleció
M	15	Supratentorial	AA	36	Neg	Vivo
M	13	Supratentorial	AA	17	Neg	Pérdida al seguimiento
M	10	Supratentorial	AA	58	Neg	Vivo
F	5	Supratentorial	AA	33	Neg	Pérdida al seguimiento
F	3	Supratentorial	GM	49	Pos	Falleció
F	12	Supratentorial	GM	5	Pos	Falleció
M	11	Cerebelo	GM	10	Pos	Falleció
F	11	Supratentorial	AA	20	Pos	Pérdida al seguimiento
M	17	Tallo cerebral	AA	36	Neg	Vivo

M = masculino, F = femenino, GM = glioblastoma multiforme, AA = astrocitoma anaplásico, Pos = positivo, Neg = negativo

Los pacientes de 11 años o menos fallecieron significativamente más que los mayores de 12 años (90 versus 40 %, prueba exacta de Fisher  $p = 0.021$ , OR = 2.273, IC 95 % = 1.040-4.967). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la sobrevida de acuerdo con la histología del tumor (prueba exacta Fisher  $p = 0.438$ , OR = 1.212, IC 95 % = 0.651-2.258), la localización del mismo ( $\chi^2 = 0.687$ ) ni el sexo del paciente (prueba exacta de Fisher  $p = 0.562$ , OR = 1.1, IC 95 % = 0.602-2.011).

La sobrevida global actuarial de los pacientes fue de 80, 61 y 49 % a 120 meses (Figura 1), con una mediana de sobrevida de 95.13 meses. La sobrevida actuarial en los pacientes que expresaron el antígeno Ki67 fue de 66, 48 y 39 % a uno, cinco y 10 años, respectivamente (mediana 57.69 meses) versus 100, 88 y 88 % a uno, cinco y 10 años, respectivamente, en quienes no lo expresaron (mediana 60 meses) (Figura 2).

Los pacientes cuya edad al diagnóstico fue de 11 años o menos tuvieron una sobrevida de 81, 44 y 22 % a uno, cinco y 10 años, respectivamente (mediana de 56.4 meses), comparados con 80 % (uno, cinco y 10 años) en aquellos con edad de 12 años o más (mediana de 120 meses) (Figura 3).

## Discusión

La sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado ha sido informada en la mayoría de los estudios internacionales como mala, con medias de seguimiento de seis a nueve meses. A partir de fines de la década de 1990, la sobrevida se ha visto incrementada con la introducción de la quimioterapia neoadyuvante, en particular con el esquema de quimioterapia utilizando tres drogas (ifosfamida, carboplatino, VP16), ya que se demostró que la barrera hematoencefálica en las áreas adyacentes al tumor estaba disfuncional, y más todavía al dar esta secuencia quimioterápica en los 14 días posteriores a la cirugía, días en los cuales las células tumorales entran en ciclo celular, con una fracción de crecimiento más acelerada y, por lo tanto, mayor sensibilidad al tratamiento.<sup>14</sup>

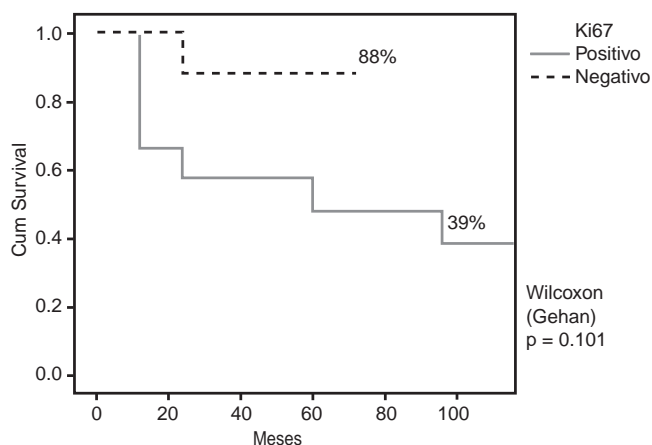


Figura 2. Sobrevida de acuerdo con la expresión del antígeno Ki67.

No obstante que la sobrevida en pacientes con astrocitoma de alto grado en nuestro hospital alcanzó 61 % a cinco años del diagnóstico, es importante destacar que continúa existiendo un grupo de pacientes que tiene mal pronóstico, por lo tanto, es importante determinar los factores que llevan a un peor pronóstico y de esta manera diferenciarlos y tratarlos de manera más agresiva.

Tradicionalmente se ha considerado que los pacientes con astrocitoma de alto grado, subgrupo glioblastoma multiforme tienen peor pronóstico; de acuerdo con nuestra serie, no existió diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo de pacientes con astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme. Sin embargo, 90 % de los pacientes con glioblastoma multiforme sobreexpresaron Ki67, mientras solo 30 % de los que tuvieron astrocitoma anaplásico lo hicieron; encontramos que el riesgo para una histología agresiva (glioblastoma multiforme) cuando se sobreexpresa Ki67 es seis veces mayor.

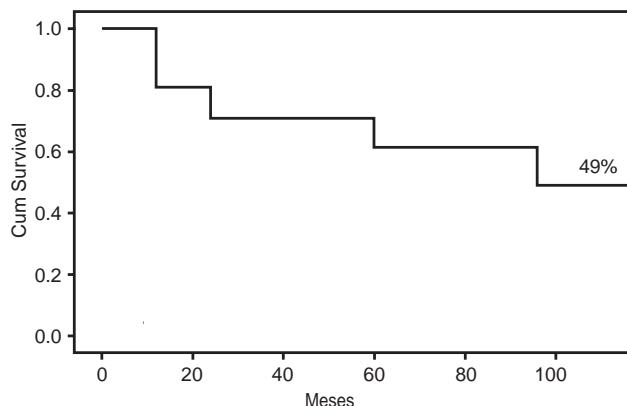


Figura 1. Sobrevida global.

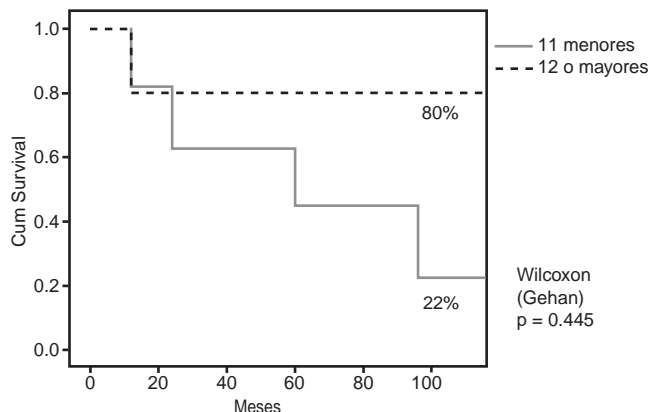


Figura 3. Sobrevida de acuerdo con la edad.

Ki67 es un antígeno monoclonal IgG1 descubierto en 1983 por Gerdes, presente en las células proliferantes y ausente en las células en reposo, aunque la función de este antígeno no permanece clara.<sup>28</sup> Recientemente se ha estudiado la importancia y el valor de los anticuerpos proteicos expresados en las células proliferantes, como el Ki67, estudiado en varios tipos de tumores, sin embargo, hasta esta década se ha visto su importancia en tumores astrocíticos. El antígeno Ki67 reconoce una proteína expresada en todas las fases del ciclo celular excepto en las fases G0 y fases tempranas de G1, justamente en las que se expresan las células de los tumores que se consideran con más baja proliferación celular y, por lo tanto, menos agresivos; es decir, los tumores que expresan el antígeno Ki67 son tumores con alta proliferación celular, agresivos e invasores, lo que pudiera sugerir dar un tratamiento más agresivo a los pacientes con este antígeno.

En nuestra serie, la sobrevida a uno, cinco y 10 años para el grupo de pacientes que expresaban el antígeno Ki67 positivo fue de 66, 48 y 39 %, comparada con el grupo de pacientes que no la expresaron, con una sobrevida de 100, 88 y 88 % al mismo periodo. Aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa, tiene una significancia clínica importante. Llama la atención que de las nueve defunciones, ocho expresaron el antígeno Ki67 positivo; es importante mencionar que de los 12 pacientes con Ki67 positivo ocho fallecieron, lo cual traduce un riesgo cuatro veces más alto de fallecer en comparación con quienes no lo expresaron. Estos hallazgos son similares a los informados por David Ellison<sup>29</sup> en una cohorte de 123 pacientes adultos, quien demostró disminución en la sobrevida de los pacientes que expresaban Ki67 en comparación con quienes no lo hacían ( $p = 0.04$ ). La positividad para Ki67 en astrocitomas pilocíticos ha sido asociada con comportamiento más agresivo y con más alto riesgo de progresión; estos resultados indican que realizar la inmunohistoquímica para Ki67 predice un patrón de sobrevida en pacientes con tumores astrocíticos, lo cual conlleva a estratificar de una manera más acuciosa a los pacientes con astrocitoma que tradicionalmente han sido considerados como de bajo riesgo, ya que la histopatología convencional parece ser limitada y, por lo tanto, ya no puede ser valorada como suficiente para el diagnóstico y pronóstico de estos pacientes. Al respecto, Johanssen no encontró una asociación entre la sobreexpresión de Ki67 y la histología.<sup>30</sup> Esto contrasta con lo identificado en nuestro estudio, ya que existió una asociación significativa entre la expresión de Ki67 y la histología del tumor.

Otro marcador investigado en estos pacientes es el oncogén p53,<sup>31</sup> del cual también se ha demostrado que su sobreexpresión conlleva menor sobrevida en pacientes con astrocitomas y que una mutación de este gen se asocia con menor mediana de supervivencia. En el 2000, Tarick Tihan<sup>32</sup> informó un valor predictivo al asociar Ki67 y P53 en pacientes portadores de astrocitoma difuso, encontrando que niveles mayores de 15 % indican peor pronóstico y que pareciera ser de más impacto que lo sugerido por la clasificación histológica, y que los tratamientos debieran adecuarse a estos hallazgos. Estos y otros marcadores moleculares son de

suma importancia para estratificar de manera más adecuada el riesgo de estos pacientes.

En nuestra serie, la sobrevida global para todo el grupo en general fue de 80, 61 y 49 % a uno, cinco y 10 años sin hacer meseta, presentando incluso un declive en la curva en el mes 91, lo cual quiere decir que no podemos considerar a estos pacientes como curados y por lo tanto requieren vigilancia de por vida. Cabe mencionar que una paciente presentó recaída y falleció incluso después de 10 años de vigilancia.

Un hallazgo interesante fue encontrar que el pronóstico de niños menores de 11 es malo. Tradicionalmente se consideraba que el pronóstico en función de la edad aplica cuando son niños menores de tres años, debido al hecho de que no reciben radioterapia por encontrarse en un periodo de desarrollo del sistema nervioso central. Sin embargo, se ha informado una diferencia en la biología molecular de los glioblastomas de niños y adultos, pudiendo ser que este comportamiento comience a partir de la adolescencia. Faury y colaboradores indicaron en 2007 que dentro de los glioblastomas de pacientes pediátricos hay dos subgrupos: aquellos con un perfil más agresivo parecido al de los adultos, y otro con un perfil más benigno no asociado a la activación de Akt y Ras.<sup>33</sup> Sin embargo, los autores no refieren si existe una correlación de estos perfiles de expresión con la edad del paciente.

Por último, es importante mencionar que sin ser el objetivo del trabajo calcular costos y beneficios, debe resaltar que éste es un estudio de inmunohistoquímica relativamente sencillo y económico, dado que el kit completo para 100 pacientes tiene un costo de 500 dólares, es decir, cada prueba tendría un costo de 5 dólares a cambio de la profusa información que este antígeno puede proporcionar.

## Referencias

1. Gurney J, Smith M, Bunin G. CNS and miscellaneous intracranial and intraspinal neoplasms. En: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, editors. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. NIH Pub No 99-4649. Bethesda MD: National Cancer Institute, SEER Program; 1999. pp. 51-63.
2. Dirección General de Epidemiología. Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Morbilidad, regionalización 1993-1996 y mortalidad. Tendencias 1985-1995. México: Secretaría de Salud; 1998.
3. Sepúlveda-Vildósola AC, López-Aguilar E. Epidemiology of central nervous system tumors in children: report of the Mexican Brain Tumor Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:454.
4. Dohrmann GJ, Farewell JR, Flannery JT. Astrocytomas in childhood: a population based study. *Surg Neurol* 1985;23:64-68.
5. Halperin EC, Watson DM, George SL. Duration of symptoms prior to diagnosis is related inversely to presenting disease stage in children with medulloblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:867-865.
6. Starr A, Achor J. Auditory brain stem responses in neurological disease. *Arch Neurol* 1975;32:761-768.
7. Omuro A, Leite C, Mokhtari K, Delattre J. Review. Pitfalls in the diagnosis of brain tumours. *Lancet Neurol* 2006;5:937-948.
8. Yang P, Berger P, Cohen M, Duffner PK. Computed tomography and childhood seizure disorders. *Neurology* 1979;29:1084-1088.
9. Vézina LG. Imaging of central nervous system tumors in children: advances and limitations. *J Child Neurol* 2008;23:1128-1135.
10. Bloom HJG. Prospects for increasing survival in children with medulloblastoma: present and future studies. *Multidisciplin Aspects Brain Tumor Ther* 1979;1:245-251.



11. **Cohen BH, Zeltzer PM, Boyett JM, Geyer JR, Allen JC, Finlay JL, et al.** Prognostic factors and treatment results for supratentorial primitive neuroectodermal tumors in children using radiation and chemotherapy: A Children's Cancer Group randomized trial. *J Clin Oncol* 1995;13:1687-1696.
12. **Nejat F, El Khashab M, Rutka J.** Initial management of childhood brain tumors: neurosurgical considerations. *J Child Neurol* 2008;23:1136-1148.
13. **Ziegler DS, Cohn RJ, McCowage G, Álvaro F, Oswald C, Mrongovius R, et al.** Efficacy of vincristine and etoposide with escalating cyclophosphamide in poor-prognosis pediatric brain tumors. *Neuronology* 2006;8:53-59.
14. **López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC, Rivera-Márquez H, Cerecedo-Díaz F, Valdés-Sánchez M, Delgado-Huerta S, et al.** Preirradiation ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) for the treatment of high-grade astrocytomas in children. *Childs Nerv Syst* 2003;19:818-823.
15. **Leibel SA, Scott CB, Loeffler JS.** Contemporary approaches to the treatment of malignant gliomas. *Semin Oncol* 1994;21:126-131.
16. **López-Aguilar E, Cerecedo-Díaz F, Sepúlveda-Vildósola A, Rivera-Márquez H, Castellano-Toledo A, Arias-Gómez J, et al.** Astrocitomas en pediatría. Factores pronósticos. *Gac Med Mex* 1997;133:231-235.
17. **López-Muñoz A, Gutiérrez JC, García-Fernández C, Herrero A.** Valor pronóstico de los marcadores tumorales de proliferación celular y angiogénesis en los oligodendrogliomas. *Oncología* 2000;27:289-296.
18. **Gutmann DH, James CD, Poyhonen M, Louis DN, Ferner R, Guha A, et al.** Molecular analysis of astrocytomas presenting after age 10 in individuals with NF1. *Neurology* 2003;61:1397-1400.
19. **Thorp SH.** Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. *J Mol Pathol* 1997;50:198-200.
20. **Hilton D, Love S, Barber R, Ellison D, Sandeman DR.** Accumulation of p53 and Ki-67 expression do not predict survival in patients with fibrillary astrocytomas or the response of these tumours to radiotherapy. *Neurosurgery* 1998;42:724-729.
21. **Montine TJ, Vandersteenhoven JJ, Aguzzi A, Boyko OB, Dodge RK, Kerns BJ, et al.** Prognostic significance of Ki-67 proliferation index in supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms. *Neurosurgery*.1994; 34:674-679.
22. **Tihan T, Davis R, Elowitz E, DiCostanzo D, Moll U.** Practical value of Ki-67 and P53 labelling indexes in stereotactic biopsies of diffuse and pilocytic astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:108-113.
23. **Johannessen A, Thorp SH.** The Clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol* 2006;12:143-147.
24. **Isolan GR.** Astrocytic neoplasms and correlation with mutate p53 and Ki-67 proteins. *Arq Neuropsiquiatr* 2005;63:997-1004.
25. **Heegaard S, Sommer HM, Broholm H, Broendstrup O.** Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry of oligodendrogliomas with special reference to prognosis. *Cancer*. 1995;76:1809-1813.
26. **Grotzer M, Janss A, Georger B, Zhao H, Rorke LB, Phillips PC.** Prognostic significance of Ki 67 (M1B1) proliferation index in childhood primitive neuroectodermal tumours of the central nervous system. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:268-273.
27. **Brown DC, Gatter KC.** Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990;17:489-503.
28. **Gerdes J, Schuan V, Lenke H.** Prediction of a mouse monoclonal antibody reaction with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Can* 1983;31:13-20.
29. **Ellison DW, Steart PV, Bateman AC, Pickering RM, Palmer JD, Weller RO.** Prognostic indicators in a range of astrocytic tumors: an immunohistochemical study with Ki-67 and p53 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;59:413-419.
30. **Johanssen A, Etorp S.** The clinical value of Ki67 in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res* 2006;12:143-147.
31. **Pollack I, Ronald L.** The relationship between TP53 mutations and overexpression of p53 and prognosis of malignant gliomas. *Cancer Res* 1997;57:304-309.
32. **Tihan T, Davis R, Elowitz E.** Practical value of Ki67 and p53 level indexes in diffuse and pilocytic astrocytoma. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:108-113.
33. **Faury D, Nantel A, Dunn SE, Guiot MC, Haque T, Hauser P, et al.** Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J Clin Oncol* 2007;25:1196-1208.