André de Macedo Bianco

**Expressão de *CXCR7* e *CXCR4* em astrocitomas
infiltrativos em relação ao tecido cerebral não
neoplásico e sua interação com *HIF1 α* e *IDH1***

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

Programa de Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bianco, André de Macedo

Expressão de *CXCR7* e *CXCR4* em astrocitomas infiltrativos em relação ao tecido cerebral não neoplásico e sua interação com *HIF1 α* e *IDH1* / André de Macedo Bianco. -- São Paulo, 2013.

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

Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.*CXCR7* proteína humana 2.Receptores *CXCR4* 3.Receptores de quimiocinas 4.*IDH1* proteína humana 5.Subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia 6.Primers DNA/genética 7.RNA mensageiro 8.Expressão gênica 9.Reação em cadeia de polimerase em tempo real 10.Mutação/genética 11.Astrocitoma/genética 12.Glioblastoma 13.Neoplasias encefálicas/patologia 14.Neoplasias encefálicas/genética 15.Imunoistoquímica 16.Análise de sobrevida

USP/FM/DBD-222/13

Dedicatória

Aos meus pais, minha inspiração, por terem proporcionado todas as condições para minha realização pessoal e profissional

A minha esposa Danielle e meus filhos Helena e Felipe pelo apoio irrestrito, compreensão e amor, essenciais durante a realização deste trabalho

Agradecimentos

À Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie pela sua orientação, comprometimento, incentivo e extrema dedicação em todas as suas atividades.

Ao Prof. Gilberto Machado de Almeida pelos seus ensinamentos e ética profissional.

Ao Dr. Milton Shibata pelo apoio, amizade e dedicação durante minha formação.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Pires Aguiar pela amizade e incentivo à minha pós-graduação.

À Dra. Sueli Mieko Oba-Shinjo pela sua colaboração na realização deste estudo

À equipe do Laboratório LIM 15 da Faculdade de Medicina da USP, pelo apoio durante a realização deste trabalho; em especial à Miyuki Uno, Thais Galatro e Mazé pela colaboração e realização do PCR, imuno-histoquímica e imunofluorescência.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	7
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1	Quimiocinas	10
3.2	IDH1	20
3.3	HIF-1.....	22
3.4	Angiogênese	24
4	MÉTODOS	27
4.1	Análise prévias dos dados de <i>microarray</i> de oligonucleotídeos entre AGII e tecido cerebral NN	28
4.2	Amostras tumorais	29
4.3	Caracterização demográfica.....	29
4.4	Análise da expressão gênica	30
4.4.1	Extração de RNA	30
4.4.2	Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição Reversa	30
4.4.3	Desenho de <i>primers</i> para PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	31
4.4.4	PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR).....	32
4.4.5	Quantificação relativa de expressão gênica	34
4.4.6	Status mutação <i>IDH1</i>	34
4.5	Análise da expressão proteica por imuno-histoquímica	34
4.6	Imunofluorescência.....	35
4.7	Análise estatística	36

5	RESULTADOS	37
5.1	Caracterização demográfica.....	38
5.2	Análise da expressão gênica do <i>CXCR7</i> , <i>CXCR4</i> , <i>HIF1α</i> e <i>IDH1</i>	39
5.2.1	Expressão associada dos genes estudados nos astrocitomas grau II.....	44
5.2.2	Expressão associada dos genes estudados nos glioblastomas.....	46
5.2.3	Expressão relativa do <i>CXCR7</i> e <i>CXCR4</i> em relação à expressão do <i>HIF1α</i> nos astrocitomas difusamente infiltrativos.....	48
5.2.4	Expressão relativa do <i>CXCR7</i> , <i>CXCR4</i> e <i>HIF1α</i> em relação ao status de mutação de <i>IDH1</i>	49
5.3	Expressão proteica do <i>CXCR7</i>	53
5.4	Imunofluorescência.....	55
5.5	Análise da expressão gênica do <i>CXCR7</i> e sobrevida geral dos pacientes com GBM	56
5.6	Análise da expressão gênica do <i>CXCR4</i> e sobrevida geral dos pacientes com GBM	57
5.7	Análise da expressão gênica combinada do <i>CXCR7/CXCR4</i> e sobrevida geral dos pacientes com GBM	58
6	DISCUSSÃO	59
6.1	Expressões relativas de <i>CXCR7</i> e <i>CXCR4</i> aumentam com o grau de malignidade nos astrocitomas difusamente infiltrativos	60
6.2	A expressão proteica de <i>CXCR7</i> nas células endoteliais, assim como nas células tumorais, foi crescente com o incremento da malignidade em astrocitomas	62
6.3	As expressões de <i>CXCR4/CXCR7</i> se associam à expressão de <i>HIF1α</i> particularmente em GBM	64
6.4	A presença de mutação no <i>IDH1</i> associa-se a uma menor expressão de <i>CXCR7</i> e <i>CXCR4</i>	64
7	CONCLUSÕES	67
8	ANEXOS	69
9	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS

2HG	2 hidroxiglutarato
ADP	adenosina difosfato
AGII	astrocitoma grau II
AGIII	astrocitoma grau III
AGIV	astrocitoma grau IV
Akt	proteína treonina quinase
ATP	adenosina trifosfato
CBTRUS	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>
CDK4	ciclina dependente de quinase 4
Ct	<i>cycle threshold</i>
CXCL12	quimiocina CXC 12
CXCR4	receptor 4 de quimiocina CXC
CXCR7	receptor 7 de quimiocina CXC
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAC	ácido desoxirribonucleico complementar
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EGFRvIII	receptor do fator de crescimento epidérmico variante III
GBM	glioblastoma multiforme
GPCR	receptor acoplado a proteína G
GUSB	beta-glucuronidase
H.R.	<i>hazard ratio</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIF-1	fator 1 induzido por hipóxia
HPRT	<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase</i>
HRE	elementos de resposta à hipóxia
HUVEC	linhagem de célula endotelial de veia umbilical humana
IDH	gene isocitrato deidrogenase
IHQ	imuno-histoquímica
kDa	kilodalton
KPS	Karnofsky
LOH	perda da heterozigosidade

MAPK	proteína quinase mitógeno ativada
MDM2	mouse Double minute 2
MGMT	O6-methylguanine-DNA methyltransferase
MTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nM	nano-molar
NN	não neoplásico
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>p</i>	probabilidade
<i>p53</i>	gene p53
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia de polimerase
PDGFR	receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta
PHD	prolil hidroxilase
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase
PTEN	gene fosfatase e tensina homóloga
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
<i>r</i>	coeficiente de correlação
<i>Rb</i>	gene retinoblastoma
RNA	ácido ribonucleico
RNAc	ácido ribonucleico complementar
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
SDF-1 α	fator derivado do estroma 1 α
SNC	Sistema Nervoso Central
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
terminal C	carboxi-terminal
terminal N	amino-terminal
U87MG	<i>Human glioblastoma-astrocytoma, epithelial-like cell line</i>
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VPL	gene von Hippel Lindau
α -KG	α -cetogluturato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quimiocinas e metástase. Células tumorais expressam receptores de quimiocinas.....	3
Figura 2. Estrutura das quimiocinas.....	10
Figura 3. Diagrama representando o sistema de quimiocinas, receptores transmembranares e seus ligantes.....	12
Figura 4. Quimiocinas angiogênicas e angiostáticas e seus receptores nas células endoteliais de seres humanos.....	13
Figura 5. Receptor transmembrana acoplado à proteína G	14
Figura 6. Via CXCL12.....	15
Figura 7. Quimiocinas e seus receptores no microambiente tumoral.	16
Figura 8. Esquema representando o aumento do CXCR4 em GBM.....	18
Figura 9. Níveis de expressão do RNAm de <i>CXCR7</i> analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR	40
Figura 10. Níveis de expressão do RNAm de <i>CXCR4</i> analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR	41
Figura 11. Níveis de expressão do RNAm de <i>IDH1</i> analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR	42
Figura 12. Níveis de expressão do RNAm de <i>HIF1α</i> analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR	43
Figura 13. Correlação da expressão associada nos AGII.....	45
Figura 14. Correlação da expressão associada nos GBM.	47
Figura 15. Expressão relativa mediana do <i>CXCR7</i> e <i>CXCR4</i> em relação expressão <i>HIF1α</i> : (-) hipoexpresso e (+) hiperexpresso ($p = 0,001$)	48
Figura 16. Níveis de expressão RNAm <i>CXCR7</i> em relação ao status de mutação do <i>IDH1</i>	49

Figura 17. Níveis de expressão RNAm <i>CXCR4</i> em relação ao status de mutação do <i>IDH1</i>	50
Figura 18. Níveis de expressão RNAm <i>HIF1α</i> em relação ao status de mutação do <i>IDH1</i>	51
Figura 19. Heatmap demonstrando a expressão relativa dos genes nos astrocitomas em relação estado de mutação <i>IDH1</i>	52
Figura 20. Fotomicrografias com expressão da proteína CXCR7 por imuno-histoquímica.....	54
Figura 21. Expressão proteica de CXCR7 por imunofluorescência em células da linhagem U87MG de glioblastoma demonstrando marcação fluorescente em verde de CXCR7 no citoplasma celular e alguns poucos núcleos com granulação fluorescente também no núcleo.	55
Figura 22. Kaplan Meyer dos pacientes com GBM em relação ao nível de expressão do <i>CXCR7</i>	56
Figura 23. Kaplan Meyer dos pacientes com GBM em relação ao nível de expressão do <i>CXCR4</i>	57
Figura 24. Kaplan Meyer dos pacientes com GBM em relação ao nível de expressão combinada do <i>CXCR7</i> e <i>CXCR4</i>	58
Figura 25. Diagrama ilustrando as possíveis realções entre os receptores CXCR7 e CXCR4 e a mutação IDH1 e a expressão HIF1 α	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência e concentração dos pares de <i>primers</i> para PCR em tempo real, tamanho do produto e eficiência da amplificação	32
Tabela 2. Dados demográficos dos pacientes analisados neste estudo.....	38
Tabela 3. Expressão mediana dos genes em relação às amostras de astrocitoma	39
Tabela 4. Expressão associadas dos genes analisados em combinação dois a dois nos AGII. Spearman's rho	44
Tabela 5. Expressão associada dos genes analisados em combinação dois a dois nos GBM. Spearman's rho	46

RESUMO

Bianco AM. *Expressão de CXCR7 e CXCR4 em astrocitomas infiltrativos em relação ao tecido cerebral não neoplásico e sua interação com HIF1 α e IDH1* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 96p.

Introdução: Existem dados suficientes disponíveis demonstrando a importância da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 na progressão tumoral e angiogênese dos gliomas. O CXCR4 é regulado positivamente pelo HIF1 α . Recentemente um novo receptor com maior afinidade à CXCL12 foi identificado, o receptor órfão RDC1, agora denominado CXCR7. O objetivo deste estudo é investigar a expressão de mRNA CXCR7 em tecidos astrocitomas difusos e avaliar suas interações com expressão CXCR4 e HIF1 α , bem como analisar sua relação com mutação do IDH1. **Métodos:** A expressão do CXCR7, CXCR4, IDH1 e HIF1 α foram avaliadas por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) em 129 amostras congeladas de astrocitomas (25 astrocitoma difuso - AGII, 18 de astrocitoma anaplásico - AGIII e 86 glioblastoma - GBM) e 22 amostras de tecido cerebral não neoplásico (NN) obtidos de cirurgia de epilepsia. A mutação do IDH1 previamente determinada foi analisada em relação aos níveis de expressões de mRNA do CXCR7, CXCR4 e HIF1 α , combinado com os parâmetros clínico-patológicos e sobrevida global. Adicionalmente, a expressão proteica do CXCR7 foi analisada por imunohistoquímica em astrocitomas de diferentes graus e em linhagem celular de glioma (U87MG) por microscopia confocal. **Resultados:** Houve diferença significativa nos níveis de expressão dos genes estudados entre astrocitomas e NN ($p < 0,001$). Na análise da expressão gênica associada nos AGII não se observou correlação entre os níveis de expressão de CXCR7/HIF1 α ($p = 0,548$); observou-se correlação significativa entre CXCR7/IDH1 ($p < 0,001$) e CXCR7/CXCR4 ($p = 0,042$). Nos GBM houve correlação significativa entre CXCR7/CXCR4 ($p = 0,002$), CXCR7/IDH1 ($p < 0,001$) e CXCR7/HIF1 α ($p = 0,008$). Hiperexpressão do HIF1 α foi associado com maior expressão do CXCR7 e CXCR4 ($p = 0,001$), enquanto a presença de IDH1 mutado foi associada a menor expressão de mRNA do CXCR7 e CXCR4 ($p = 0,009$). A expressão proteica de CXCR7 foi identificada em todas as amostras estudadas, e aumentou com malignidade. A proteína CXCR7, na linha celular U87MG, foi localizada principalmente na membrana celular. **Conclusão:** O CXCR7 é um gene diferencialmente expresso em astrocitomas difusamente infiltrativos em relação tecido cerebral não neoplásico. O nível de expressão do CXCR7 correlacionou-se significativamente com os níveis de expressão do CXCR4 e IDH1 nos AGII e com CXCR4, IDH1 e HIF-1 α nos GBM. O nível de expressão elevado do CXCR7 e CXCR4 correlacionou-se com nível elevado de expressão de HIF-1 α , enquanto a presença da mutação do IDH1 associou-se a níveis reduzidos de CXCR7 e CXCR4. Não se observou associação significativa entre os níveis de expressão de CXCR7 e CXCR4 com os dados de sobrevida.

Descritores: 1.CXCR7 proteína humana 2.Receptores CXCR4 3.Receptores de quimiocinas 4.IDH1 proteína humana 5.Subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia 6.Primers DNA/genética 7.RNA mensageiro 8.Expressão gênica 9.Reação em cadeia de polimerase em tempo real 10.Mutação/genética 11.Astrocitoma/genética 12.Glioblastoma 13.Neoplasias encefálicas/patologia 14.Neoplasias encefálicas/genética 15.Imunoistoquímica 16.Análise de sobrevida

ABSTRACT

Bianco AM. *CXCR7 and CXCR4 expressions in infiltrative astrocytomas and their interactions with HIF1 α and IDH*. [thesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo, in 2013. 96p.

Introduction: There is abundant evidence showing that chemokine CXCL12 and its receptor *CXCR4* are involved in glioma progression and angiogenesis. *CXCR4* is upregulated by *HIF1 α* . The *CXCR7*, a recent additional receptor for CXCL12 with higher affinity than *CXCR4* has raised key issues on glioma cell migration. The aim of this study is to investigate the *CXCR7* mRNA expression in diffuse astrocytoma tissues and to evaluate its interactions with *CXCR4* and *HIF1 α* expression and *IDH1* mutation. **Methods:** *CXCR7*, *CXCR4*, *IDH1* and *HIF1 α* expressions were evaluated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in 129 frozen samples of astrocytoma (25 diffuse astrocytomas - AGII, 18 anaplastic astrocytomas - AGIII and 86 glioblastomas - GBM) and 22 samples of non-neoplastic tissue cerebral (NN) from epilepsy surgery. *IDH1* mutation status was analyzed with *CXCR7*, *CXCR4* e *HIF1 α* mRNA expressions, matched with clinicopathological parameters and overall survival time. Furthermore, *CXCR7* protein expression was analyzed by immunohistochemistry in different grades of astrocytoma and in glioma cell line (U87MG) by confocal microscopy. **Results:** There was significant difference in the expression levels of the genes studied between astrocytomas and NN ($p < 0.001$). The analysis of associated gene expressions in AGII showed no significant correlation between *CXCR7/HIF1 α* ($p = 0.548$); there was significant correlation between *CXCR7/CXCR4* ($p = 0.042$) and *CXCR7/IDH1* ($p = 0.008$). In GBM, there were significant correlations between *CXCR7/CXCR4* ($p = 0.002$), *CXCR7/IDH1* ($p < 0.001$) and *CXCR7/HIF1 α* ($p = 0.008$). *HIF1 α* overexpression was associated with higher expressions of *CXCR7* and *CXCR4* ($p = 0.001$), while presence of *IDH1* mutation was associated with lower *CXCR7* and *CXCR4* mRNA expressions ($p = 0.009$). Protein expression was identified in all samples studied, and it increased with malignancy. *CXCR7* protein, in U87MG cell line, was mainly localized in the cellular membrane. **Conclusion:** *CXCR7* was overexpressed in astrocytoma of different grades of malignancy compared to non-neoplastic brain tissue. *CXCR7* expression levels correlates with *CXCR4* and *IDH1* in AGII and *CXCR4*, *IDH1* and *HIF1 α* in GBM. Overexpression *HIF1 α* was related with higher expressions of *CXCR7* and *CXCR4*, otherwise presence of *IDH1* mutation related with lower expression of both genes. Protein expression level was associated with the degree of malignancy. The results revealed no significant association between *CXCR7* and *CXCR4* expression and survival data.

Descriptors: 1.CXCR7 protein, human 2.Receptors, CXCR4 3.Receptors, Chemokine 4.IDH1 protein, human 5.Hypoxia-Inducible Factor 1, alpha Subunit 6.DNA primers/genetics 7.RNA, messenger 8.Gene expression 9.Real-time polymerase chain reaction 10.Mutation/genetics 11.Astrocytoma/genetics 12.Glioblastoma 13.Brain neoplasms/pathology 14.Brain neoplasms/genetics 15.Immunohistochemistry 16.Survival analysis

1 INTRODUÇÃO

As quimiocinas são pequenas citocinas quimiotáticas caracterizadas pela sua habilidade de induzir a migração celular em direção a um gradiente de quimiocinas (quimiotaxia) através da ligação com um receptor. Existem aproximadamente 50 ligantes e 20 receptores, divididas em quatro subfamílias de acordo com o número e posição dos resíduos de cisteínas na porção N-terminal: C, CC, CXC e CX₃C. As quimiocinas também são classificadas como homeostáticas ou inflamatórias de acordo com sua expressão constitutiva ou induzida por inflamação, respectivamente. Os receptores de quimiocinas são receptores transmembranares acoplados à proteína G (GPCR) que captam sinais extracelulares e ativam vias de transdução de sinal no interior da célula. Interessantemente esta grande família de proteínas exercem seus efeitos pleiotrópicos não somente na migração dos leucócitos, mas também em outras células originárias de diversos tipos de tecidos que expressem receptores de quimiocinas. Atuam também em vários aspectos do desenvolvimento cardíaco e neuronal, homeostasia e funcionamento do sistema imune. São amplamente expressos no sistema nervoso central (SNC), nos neurônios e nas células da glia.

A descoberta de que a disseminação metastática de células tumorais compartilha o mesmo sistema de sinalização quimiotática ^(1,2) utilizado no tráfico de leucócitos revelou um importante papel das quimiocinas na progressão e malignização tumoral ⁽³⁾ (Figura 1).

Figura 1. Quimiocinas e metástase. Células tumorais expressam receptores de quimiocinas. Órgãos que representam o destino da metástase apresentam picos de expressão dos ligantes correspondentes. (adaptado de Domanska et al. 2010)

Alterações na expressão das quimiocinas ou de seus receptores são frequentemente evidenciadas em diversas condições patológicas como doenças neurodegenerativas e tumores cerebrais ^(4,5). Receptores de quimiocinas foram identificados em gliomas e diversos relatos sobre suas funções no desenvolvimento tumoral estão descritos da literatura ^(6–11).

Há mais de uma década a interação da quimiocina CXCL12 e de seu receptor CXCR4 tem sido enfatizada na regulação da progressão tumoral nos gliomas. Nos glioblastomas (GBM) existe uma maior expressão da CXCL12 e do CXCR4 em relação ao tecido normal, estando associado principalmente a regiões tumorais adjacentes às áreas de necrose e neovascularização ⁽¹²⁾. Posteriormente, a expressão CXCR4/CXCL12 e seu papel na regulação das funções celulares em gliomas foi mais detalhadamente investigada tanto em linhagens celulares quanto em GBM ^(9,13–15). Níveis de expressão elevados de CXCR4/CXCL12 estão associados a menor tempo livre de doença em GBM primários ⁽¹⁶⁾ e menor tempo livre de progressão em gliomas de baixo grau ⁽¹⁷⁾. Além disso, a expressão do CXCR4 em pacientes e modelos animais com gliomas de alto grau tem sido associado a pior prognóstico ⁽¹⁸⁾.

O CXCR4 é regulado positivamente pelo HIF1 α , elevado em condições de hipóxia, que estimula a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), ambos hiperexpressos nas células em pseudopaliçadas de GBM; apresentando papel importante na angiogênese ^(7,19–22). Esses achados fazem do eixo CXCL12/CXCR4 um importante alvo terapêutico já em estudo no tratamento dos GBM (www.clinicaltrials.gov).

Recentemente um novo receptor com maior afinidade à CXCL12 foi identificado, o receptor órfão RDC1, agora denominado CXCR7 que também se liga a outra quimiocina, a CXCL11 ^(23,24). Em células progenitoras renais o CXCR7

demonstrou ser crítico para sobrevivência e adesão ao endotélio enquanto o CXCR4 estava envolvido na migração celular ⁽²⁵⁾. O CXCR7 é expresso em vários tumores como pulmão, mama, próstata, pâncreas e bexiga; está envolvido na proliferação celular, migração, invasão e inibição da apoptose ^(23,26–29). Além disso, é também expresso na vascularização tumoral estimulada pela hipóxia ⁽³⁰⁾.

Um estudo recente identificou que o CXCR7 é hiperexpresso em astrocitomas e em GBM *in situ* e em linhagens de GBM. Revelou também que células precursoras de glioma expressam preferencialmente CXCR4 o qual diminui com a diferenciação enquanto a expressão do CXCR7 aumenta com a diferenciação ⁽¹¹⁾. Posteriormente, outro estudo evidenciou que os níveis de expressão CXCL11 e CXCR4 estavam significativamente maiores nos GBM do que nos controles não tumorais ou gliomas de baixo grau, enquanto nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de expressão do CXCL12 e CXCR7 ⁽³¹⁾.

Os gliomas representam 70% dos tumores primários do SNC e 80% dos tumores malignos em adultos jovens (20 a 34 anos) ⁽³²⁾. São classificados histologicamente de acordo com a origem celular em astrocitomas, oligodendrogliomas ou mistos e, graduados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de acordo com uma escala crescente de malignidade ⁽³³⁾.

Os astrocitomas difusamente infiltrativos são assim designados pelo fato de invadirem o tecido cerebral através da infiltração difusa. Além da capacidade de invadir, o astrocitoma infiltrativo tem potencial significativo de desenvolver comportamento progressivamente mais maligno com o tempo. A classificação define três tipos: astrocitoma difuso (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (GBM) ⁽³³⁾. Enquanto a sobrevida mediana dos pacientes com GBM é de 12 a 15 meses, a dos pacientes com astrocitoma difuso varia de 5 a 20 anos ^(34–37).

A natureza invasiva desses tumores é atribuída a uma série de eventos moleculares envolvendo a desregulação da expressão e função de vários genes. Poucas são as alterações moleculares específicas identificadas em astrocitomas difusos. Importante salientar a mutação do *IDH1* como sendo a anormalidade genética mais frequente e consistente nos astrocitomas difusos e associada a um prognóstico relativamente mais favorável ^(38,39).

Devido a importância da relação CXCR4/CXCL12 na tumorigênese, atualmente a interação com CXCR7 é ativamente investigada para melhor entendimento da progressão tumoral. Notavelmente a expressão do *CXCR7* em tumores cerebrais tem sido pouco investigada e menos dados ainda estão disponíveis em relação aos astrocitomas difusos. Portanto, a proposta do presente estudo foi a investigação da expressão do *CXCR7* e sua associação com *IDH1* e *HIF1 α* em astrocitomas infiltrativos.

2 OBJETIVOS

Análise da expressão gênica do *CXCR7* em casuística de pacientes com astrocitoma difusamente infiltrativo (AGII, AGIII e GBM).

Análise da expressão associada do *CXCR7* com *CXCR4*, *IDH-1* e *HIF1 α* em astrocitomas difusamente infiltrativos.

Análise da expressão do *CXCR7* e *CXCR4* em relação aos níveis de expressão do *HIF1 α* e à mutação do *IDH1*.

Análise da localização da proteína codificada pelo *CXCR7* e seu comportamento com a variação da malignidade.

Correlacionar os dados de expressão gênica dos alvos analisados com o dado clínico de sobrevida geral.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Quimiocinas

As quimiocinas são proteínas de peso molecular entre 8 e 14 kilodaltons pertencentes a uma grande família das citocinas quimiotáticas que se ligam e ativam uma família de receptores. Os ligantes e os receptores são identificados respectivamente por “L” e “R”.

Estruturalmente são classificadas em quatro subfamílias de acordo com o número e posição dos resíduos de cisteína na porção N-terminal: C, CC, CXC e CX₃C. A subfamília C apresenta dois resíduos de cisteína, enquanto as outras apresentam quatro. As CXC e CX₃C diferem entre si pela presença de um e três aminoácidos entre o primeiro e o segundo resíduo de cisteína respectivamente; enquanto a CC, as duas primeiras cisteínas estão adjacentes ⁽⁴⁰⁾ (Figura 2).

Figura 2. Estrutura das quimiocinas (adaptado de Khoidai, 2004)

As quimiocinas CC (β -quimiocina) representam o maior grupo entre as quimiocinas. Os membros destas famílias são CCL1-28. São quimioatraentes para leucócitos incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, basófilos, eosinófilos, células dendríticas, mastócitos e *natural killer*. Somente os neutrófilos parecem não responderem aos estímulos quimiotáticos.

A subfamília da quimiocina C (γ -quimiocina) é representada pela XCL1 e 2, e da quimiocina CX₃C (δ -quimiocina) somente pela CX₃CL1.

As quimiocinas ligam-se a receptores transmembranares acoplados a proteína G (GPCRs). As quimiocinas CXC ligam-se a receptores CXCRs e as CC ligam-se a CCRs, enquanto as subfamílias C e CX₃C apresentam receptores específicos. Alguns receptores podem ser ativados por mais de uma quimiocina e poucos receptores apresentam alta especificidade ⁽⁴¹⁾.

São divididas em dois grupos baseadas na função e no padrão de expressão. As quimiocinas homeostáticas são constitutivamente expressas em determinados tecidos e células e apresentam função importante no desenvolvimento e manutenção da homeostasia do sistema imune e hematopoiético; enquanto as quimiocinas inflamatórias são induzidas e hiperexpressas por estímulo inflamatório (Figura 3).

As quimiocinas CXC (α -quimiocina) são subdivididas em duas categorias conforme a presença ou ausência de uma sequência específica padrão, denominada ELR, de três aminoácidos Glu (glutamato) – Leu (leucina) – Arg (arginina) na porção

N-terminal que precede o primeiro resíduo de cisteína. Funcionalmente as CXC ELR⁺ são primariamente angiogênicas. Enquanto as CXC ELR⁻ são frequentemente angiostáticas. CXCL1-3 e CXCL5-8 são angiogênicas. CXCL4, CXCL9-11 e CXCL14 são angiostáticas. A CXCL12 originalmente descrita como fator estimulante de crescimento pré-linfócito B, apesar de não conter Glu-Leu-Arg apresenta atividade angiogênica⁽⁴²⁻⁴⁴⁾ (Figura 4).

Figura 4. Quimiocinas angiogênicas e angiostáticas e seus receptores nas células endoteliais de seres humanos. (adaptado de Gerber, 2009)

Os GPCRs apresentam uma porção N-terminal no exterior da superfície celular, três alças intracelulares e três alças extracelulares e uma porção C-terminal no citoplasma. Uma das alças intracelulares acopla à proteína G e regula a junção do ligante com o receptor, da qual se inicia uma cascata de eventos de transdução de sinal através da hidrólise GTP ou da mobilização de cálcio⁽⁴⁵⁾ (Figura 5).

Figura 5. Receptor transmembrana acoplado à proteína G

A sinalização iniciada através da ativação destes receptores é responsável pela transdução de sinal, alteração do nível de cálcio intracelular e ativação de fatores de transcrição. Após a ligação da quimiocina com o GPCR a subunidade $G\alpha$ troca GDP por GTP. Ocorre a dissociação das subunidades e a $G\beta\gamma$ ativa a fosfolipase C (PLC). Isso leva o acúmulo de diacylglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP₃), onde este mobiliza o cálcio, que leva a ativação da proteína quinase C (PKC) e fosforilação de proteínas-alvo. Em paralelo a subunidade $G\alpha$ ativa a phosphatidylinositol-3-quinase que resulta em ativação da via das quinases ativadoras mitogênicas (MAPK). Ao mesmo tempo, a subunidade $G\alpha$ induz ativação adenilciclase (AC) que ativa proteína quinase A (PKA). Como resultado da ativação GPCRs, os receptores de quimiocina podem também formar heterodímeros que ativam as quinases Janus (JAK) com ativação e a transdução do sinal através da proteína quinase C e B (PKC e PKB/Akt) resultando em alterações moleculares e funcionais nas células efectoras proporcionando uma migração destas em direção a um gradiente de quimiocina (Figura 6).

Figura 6. Via CXCL12. CXCL12 liga-se com CXCR4 e CXCR7 formando homodímeros ou heterodímeros. Neste último o CXCR7 altera a conformação do complexo proteína G/CXCR4 e anula o sinal. A ligação da CXCL12 ativa o receptor GPCR e consequente sinalização através das vias clássicas PI3K/Akt, IP3 e MAPK que promove sobrevivência celular, proliferação e quimiotaxia. A via β-arrestin pode ser ativada através das quinase do GPCR (GRK) que fosforila o receptor. Quando o CXCR7 é ativado pela CXCL12 não ocorre a via clássica de mobilização do Ca^{2+} , mas sim a ativação da via β-arrestin promovendo uma redução da CXCL12. Em gliomas o CXCR7 ativa a via fosfolipase C (PLC/MAPK) aumentando a sobrevivência celular

As quimiocinas são mais conhecidas por induzir a migração celular direcional, principalmente dos leucócitos durante inflamação. Entretanto, as consequências funcionais não se limitam à quimiotaxia, mas afetam também o desenvolvimento tumoral indiretamente através da angiogênese e interação leucócitos-tumor e, diretamente influenciando a transformação tumoral, proliferação e sobrevivência celular, invasão e

metastatização, bem como transcrição gênica. A função desempenhada pelas quimiocinas é complexa, algumas favorecem o crescimento e progressão tumoral enquanto outras aumentam a imunidade antitumoral. As células tumorais, células do estroma (fibroblastos, células endoteliais) e células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) presentes nos tumores sólidos contribuem com a produção local de quimiocinas, que por sua vez podem estimular ou inibir o crescimento tumoral de forma autócrina atraindo células com atividade pró ou antitumoral. Os neutrófilos e macrófagos associados ao tumor favorecem a progressão tumoral secretando enzimas degradantes da matriz extracelular e fatores de crescimento respectivamente^(46,47) (Figura 7).

Figura 7. Quimiocinas e seus receptores no microambiente tumoral. Os tumores sólidos apresentam vários tipos de células do estroma que produzem quimiocinas e regulam a migração leucocitária. Como resultado o tumor é um infiltrado de células inflamatórias incluindo neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e células dendríticas. A produção de quimiocinas pelas células tumorais, células do estroma e leucócitos altera o processo de angiogênese, proliferação e disseminação celular (adaptado de Zagzag, 2006)

A quimiocina CXCL12, anteriormente denominada de fator 1 derivado do estroma (SDF-1), é secretada por células da medula óssea e células endoteliais além de diversos órgãos como coração, músculo esquelético, fígado e SNC ⁽²⁶⁾. A CXCL12 funciona como fator de crescimento para células progenitoras tipo B, fator quimiotático para monócitos e células tipo T, regula hematopoese e é um fator quimiotático para células-tronco ^(48,49).

A interação CXCL12/CXCR4 desempenha papel importante no desenvolvimento do SNC ^(48,50). Acredita-se que a formação das camadas corticais durante o seu desenvolvimento seja controlada pela interação CXCL12/CXCR4. O CXCL12 expresso pelas meninges neocorticais é um forte quimiotático para os neurônios que expressam CXCR4. Devido a interação, os interneurônios migram da zona proliferativa subventricular/ventricular para o seu sítio de destino, a superfície pial ⁽⁵¹⁾. Em camundongo com deficiência de CXCR4 por mutação, a migração dos interneurônios e a formação das camadas cerebelares são prejudicadas, resultando em óbito precoce logo após nascimento ⁽⁵⁰⁾. Muitas células neuronais, incluindo precursores de astrócitos e oligodendrócitos, proliferam sob estímulo de quimiocinas ⁽⁶⁾.

Uma das funções mais importantes na área oncológica das quimiocinas e seus receptores é a metastatização. As quimiocinas participam deste processo promovendo a proliferação e disseminação tumoral, aderência das células tumorais ao endotélio, extravasamento dos vasos sanguíneos, colonização metastática, angiogênese e proteção contra resposta do hospedeiro através de ativação de vias de sobrevivência como PI3K/AKT/mTOR, ERK/MAPK e JAK/STAT ^(3,52,53).

As quimiocinas desempenham também importante papel facilitando a comunicação entre células tumorais e não tumorais no microambiente tumoral, incluindo células

endoteliais e fibroblastos, e promovem infiltração e ativação dos neutrófilos e dos macrófagos associados ao tumor ^(54,55).

O CXCR4 promove angiogênese e migração de células tumorais para sítios metastáticos em diferentes neoplasias como mama ⁽⁵⁶⁾, pulmão ⁽⁵⁷⁾, ovário ⁽⁵⁸⁾, rim ⁽⁵⁹⁾ e próstata ⁽⁶⁰⁾. Um fator importante que altera o comportamento metastático das células tumorais é a hipóxia, aumentando transcrição HIF1 α que aumenta a expressão CXCR4. Em condições fisiológicas a proteína VHL regula negativamente a expressão CXCR4 através da degradação HIF1 α ^(21,61,62). O HIF1 α estimula a expressão CXCL12 que por sua vez estimula fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e consequentemente aumenta a angiogênese ^(63,64). Aumento dos níveis de CXCL12 é especialmente evidenciado em áreas de necrose, apoptose e áreas de elevada densidade microvascular ⁽¹²⁾ (Figura 8).

Figura 8. Esquema representando o aumento do CXCR4 em GBM. As células hipóxicas em pseudopaliçadas adjacentes à áreas de necrose (N) apresentam maior expressão do HIF1 α que por sua vez aumenta expressão CXCR4 nestas células. A liberação de VEGF, possivelmente proporciona um aumento da expressão do CXCR4 nas células endoteliais, promovendo a neovascularização tumoral (adaptado Zagzag, 2006)

A inibição do CXCR4 com plerixafor (AMD3100, potente antagonista específico que bloqueia ligação CXCL12 com CXCR4) diminui drasticamente a formação e metastatização tumoral em modelos animais ⁽¹⁸⁾. Recentemente o plerixafor mostrou também prevenir a recidiva tumoral após irradiação local em modelos de camundongo com GBM através da inibição do recrutamento de células-tronco da medula óssea e da angiogênese ⁽⁶⁵⁾.

O conceito de relação exclusiva entre CXCL12 e CXCR4 foi rompido após a observação de que células hepáticas de um feto de camundongo ainda se ligavam com CXCL12 após inibição CXCR4; além de discrepâncias observadas entre as expressões CXCR4 e CXCL12 em diversas linhagens de células neoplásicas ^(23,24). Um novo receptor foi identificado e denominado RDC1/CXCR7. CXCR7 apresenta afinidade com a quimiocina CXCL11 que até então se ligava somente com CXCR3.

O CXCR7 é expresso em uma grande variedade de tumores como pulmão, mama, próstata, pâncreas rim e bexiga; estando envolvido na proliferação, migração, invasão, inibição da apoptose, angiogênese e metastatização ^(23,26-30).

Hattermann et al. ⁽¹¹⁾ evidenciaram *in situ* uma maior expressão do CXCR7 nos astrocitomas de alto grau em relação tecido cerebral normal, enquanto o CXCR4, CXCL12 e CXCL11 não apresentaram alterações significativas. *In vitro*, detectou expressão do CXCR4 somente em uma das oito linhagens, enquanto CXCR7 foi detectado em todas as linhagens. Demonstrou em cultura de células que CXCR4 é expresso em células precursoras de glioma e à medida que ocorre a diferenciação, ela diminui enquanto há um aumento da expressão do CXCR7. Demonstrou, em tecido cerebral normal, que o CXCR7 e CXCR4 estavam quase que exclusivamente localizados no endotélio, enquanto nos GBM o CXCR7 localizava-se principalmente nas células tumorais.

Calatozzolo et al.⁽³¹⁾ demonstraram em espécimes cirúrgicas hiperexpressões de *CXCR4* e de *CXCL11* nos GBM em relação à gliomas de baixo grau e controle não tumoral; enquanto nenhuma diferença foi encontrada entre os níveis de expressão *CXCL12* e *CXCR7*. Através de IHQ evidenciou que a *CXCL12* estava presente em células endoteliais e tumorais de GBM, enquanto nos gliomas de baixo grau estava presente somente no endotélio. O *CXCR4* e o *CXCR7* apresentaram marcações principalmente nas células tumorais de GBM, no entanto, nenhuma marcação do *CXCR7* foi identificada em gliomas de baixo grau.

Durante a tumorigênese as células dos gliomas adquirem habilidade de usufruir do sistema das quimiocinas em vantagem própria, causando aumento da proliferação, migração e angiogênese⁽²⁾. Além disso, é cada vez mais reconhecido que as quimiocinas desempenham importante papel facilitando a comunicação entre as células cancerígenas e as células do microambiente tumoral, incluindo células endoteliais e fibroblastos, promovendo a infiltração, ativação de neutrófilos e macrófagos associados ao tumor^(54,55).

Diversos receptores de quimiocinas são expressos em gliomas. *CCR2* em glioma⁽⁶⁶⁾, GBM⁽⁶⁷⁾ e gliossarcoma⁽⁶⁸⁾; *CCR3*, *CCR4* e *CCR5* em GBM^(69–71); *CXCR1*, *CXCR2*, *CXCR3* e *CXCR5* em gliomas⁽⁷²⁾; *CXCR4* em GBM⁽⁷⁾, oligodendroglioma⁽⁷²⁾, astrocitoma⁽⁷²⁾, neuroblastoma⁽⁷³⁾ e meningioma⁽⁷²⁾; e *CXCR7* em GBM⁽¹¹⁾.

3.2 IDH1

Avanços na compreensão molecular dos gliomas estão melhorando o entendimento da patogênese tumoral, contribuindo na classificação dos tumores do SNC e separando-os em subgrupos com prognósticos distintos.

Os gliomas se desenvolvem através de um conjunto de alterações genéticas e moleculares cumulativas durante sua progressão que promovem um desarranjo nas vias de sinalização dos fatores de crescimento e nas vias que controlam o ciclo celular.

O gene isocitrato desidrogenase (*IDH*) codifica uma proteína que catalisa a carboxilação oxidativa do isocitrato em α -cetoglutarato (α -KG) e reduz NADP^+ em NADPH⁽⁷⁴⁾. Existem 5 isoenzimas IDHs, as mais importantes são IDH1 e IDH2. Os genes *IDH1* e *IDH2* apresentam uma sequência consideravelmente semelhante e uma estrutura proteica quase idêntica. O *IDH1* está localizado no citoplasma é hiperexpresso no fígado e em concentrações menores nos outros tecidos, participa do metabolismo dos lipídios e da glicose na célula e está envolvido na defesa celular contra espécies reativas de oxigênio e radiação^(75–77). O *IDH2* está localizado na mitocôndria, é hiperexpresso no coração, músculo e linfócitos ativados e moderadamente expresso em outros tecidos. Apresenta função importante na regulação do ciclo de Krebs e também contra insultos como estresse oxidativo^(78–80).

Em 2008, o sequenciamento do exoma de GBM identificou uma mutação somática no *IDH1* (2q33) em 18 (12%) de 149 pacientes com estes tumores^(81,82). Estudos subsequentes demonstraram que a mutação é muito mais frequente em AGII, AGIII e GBM secundários (70-88%) do que em GBM primários (5%)^(74,83). Aproximadamente 80% dos AGII apresentam a mutação *IDH1*⁽⁸³⁾. Análises de biópsias consecutivas do mesmo paciente evidenciou que em nenhum caso a mutação *IDH1* ocorreu após a aquisição da mutação *TP53*, sugerindo que seja um evento precoce na gliomagenese podendo acometer uma mesma população de células precursoras⁽⁷⁴⁾.

A mutação *IDH1* observada (>90%) nos gliomas grau II é uma mutação pontual na posição 132 onde a arginina é substituída pela histidina (R132H). Um estudo com mais de mil gliomas difusos demonstrou que a mutação *IDH1* (R132H) está associada à neoplasia astrocitária, enquanto a mutação *IDH2* ocorre predominantemente em neoplasias derivadas

de oligodendrócitos⁽³⁹⁾. Estes achados fazem da mutação *IDH1* a anormalidade genética mais frequente e consistente nos AGII. Existe uma forte associação entre a presença da mutação *IDH1* com mutação *TP53* ou deleção 1p/19q^(38,74,84).

Investigações iniciais demonstraram que a mutação *IDH1* reduz a atividade enzimática e consequentemente diminui a formação do α -cetoglutarato (α -KG). O α -KG no citoplasma inicia a degradação, dependente de oxigênio, da subunidade 1 α do fator induzido por hipóxia (HIF1 α). Portanto a redução da formação de α -KG aumenta os níveis de HIF1 α ⁽⁸⁵⁾.

Recentes estudos evidenciaram que a mutação *IDH1/IDH2*, não somente resulta em perda de função, mas confere um ganho enzimático. A habilidade de catalisar α -KG em 2-hidroxiglutarato (2HG) é dependente de NADPH. A função de 2HG não está totalmente esclarecida, sendo possível a sua contribuição na gliomagenese através da inibição das atividades enzimáticas dependentes do α -KG^(86,87). Desta forma a mutação *IDH1/IDH2* atuaria como oncogene, presumindo que 2HG aumentasse os níveis de HIF1 α através da inibição da prolil hidroxilase (PHD)⁽⁸⁸⁾.

Mutação *IDH1* e *IDH2* são mais comuns em pacientes jovens e estão associados com um prognóstico relativamente mais favorável^(74,83,89,90). A mutação *IDH1* é um forte fator preditivo independente de melhor prognóstico^(84,90-93).

3.3 HIF-1

O HIF-1 (fator induzido por hipóxia) é um fator de transcrição responsável pela indução específica de genes envolvidos na adaptação celular e tecidual ao microambiente hipóxico. Estão relacionados com o transporte de oxigênio e metabolismo energético, angiogênese, proliferação, motilidade e invasão celular⁽⁹⁴⁾.

O HIF-1 é composto por duas subunidades: α e β . O gene *HIF1 α* está localizado no cromossomo 14q21-q24 enquanto que o gene *HIF1 β* está localizado no cromossomo 1q21. Embora o HIF1 β seja constitutivamente expresso e os níveis de RNAm e proteico são mantidos constantes independente da concentração de oxigênio. O HIF1 α apresenta meia vida curta e é diretamente relacionado à tensão de oxigênio ⁽⁹⁵⁾.

Em condições de normóxia o HIF1 α é rapidamente degradado tornando seus níveis proteicos praticamente indetectáveis. Na presença de oxigênio o HIF1 α é hidroxilado em resíduos específicos e reconhecido pelo gene supressor tumoral von Hippel Lindau (*VHL*) levando a ubiquitinação e degradação proteossômica. Durante a hipóxia o HIF1 α torna-se estável e sofre translocação do citoplasma para o núcleo, onde dimeriza-se com HIF-1 β e forma o complexo HIF-1 transcripcionalmente ativo. O HIF-1 liga-se aos elementos de resposta à hipóxia (HRE) e induz a atividade transcripcional de genes fundamentalmente envolvidos na angiogênese e invasão tumoral, sobrevida e metabolismo celular ^(96,97).

A atividade do HIF1 α também pode estar aumentada em decorrência da ativação de mecanismos não hipóxicos. O HIF1 α e seus co-ativadores podem ser diretamente fosforilados através da via p42/p44-MAPK proporcionando um aumento da atividade transcripcional do complexo HIF-1. A inativação TP53, por mutação somática ou inativação funcional, pode resultar em aumento da expressão de HIF1 α ^(98,99). A inativação do PTEN leva ao aumento da resposta transcripcional da via PI3K-AKT e também aumento da expressão HIF1 α ^(100,101).

Mais de cem genes já foram identificados em decorrência da atividade transcripcional da ativação do HIF1 α , dentre eles VEGF, SDF-1 (CXCL12), EGF, PDGF, angiotensina e angiopoetina, muitos com propriedades angiogênicas ^(87,102).

Em GBM, o *HIF1 α* é hiperexpresso nas células em pseudopaliçada adjacentes à necrose, sugerindo que o padrão de expressão do *HIF1 α* é regulado, em parte, pela oxigenação tumoral. O VEGF também está presente nas células em pseudopaliçada^(103,104). É possível que a hipóxia induza a expressão *HIF1 α* que consequentemente ativa a transcrição do gene *VEGF* produzindo uma atividade angiogênica.

Outro gene positivamente regulado pelo *HIF1 α* via HRE é *CXCR4*^(7,62). O CXCR4 é o receptor da quimiocina CXCL12 (fator 1 derivado de célula do estroma, SDF-1), uma importante molécula associada com a progressão tumoral e metastatização em diferentes tipos de tumores como pulmão, pâncreas e mama^(55,56,105–107). Identificado também em gliomas, o CXCR4 está relacionado com a progressão e invasibilidade^(9,10,12,13,108).

A hiperexpressão *HIF1 α* é comum em tumores e contribui para sobrevivência e malignização da célula tumoral, estando associado com pior prognóstico, maior mortalidade e resistência terapêutica^(109,110).

3.4 Angiogênese

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. É essencial em uma grande variedade de processos fisiológicos, como formação vascular durante a embriogênese e cicatrização de feridas; e, em processos patológicos, como inflamação crônica e crescimento de tumores^(111–114). O balanço entre fatores angiogênicos e angiostáticos presentes no microambiente regulam o processo de angiogênese. Em condições fisiológicas o processo de angiogênese é estritamente controlado e transitório⁽⁴⁴⁾.

No microambiente tumoral ocorre um predomínio dos fatores angiogênicos que estimulam descontrolada e desorganizadamente o crescimento vascular. Estes fatores podem ser secretados por células neoplásicas, endoteliais, células do estroma, células da corrente sanguínea e também da matriz extracelular ^(115,116). Fatores angiogênicos incluem VEGF, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento placentário, angiopoetina 2 e interleucinas. Fatores angiostáticos incluem angiostatina, endostatina e trombopodina 1 ^(117,118).

Estudos de angiogênese tumoral e biologia endotelial são baseados em linhagem de célula endotelial de veia umbilical humana (HUVEC), célula endotelial de tecido tumoral e não tumoral. A comparação entre célula endotelial de tecido tumoral e não tumoral tem sido descrita em diversos tumores sistêmicos ⁽¹¹⁹⁾. As células endoteliais provenientes de tumores apresentam um fenótipo ativado em decorrência da hiperexpressão de fatores angiogênicos. Dados recentes sugerem que células endoteliais derivadas de GBM apresentam propriedades fenotípicas e funcionais distintas das células endoteliais não tumorais ^(120,121). Células endoteliais de GBM apresentam hiperexpressão VEGF, CXCL12 e CXCR7 em relação às HUVEC e não apresenta expressão CXCR4 ⁽¹²²⁾. Essas diferenças poderiam justificar uma resposta menos efetiva de terapias anti-angiogênicas no caso das moléculas-alvo situarem somente nas células endoteliais de tecido não tumoral.

A angiogênese está relacionada com o grau de malignidade dos gliomas e é frequentemente associada ao prognóstico. Pacientes com elevada densidade microvascular tumoral apresentam menor sobrevida ^(123,124).

Alguns dos fatores responsáveis pela resistência dos gliomas às terapias existentes são a neovascularização tumoral e a invasibilidade das células tumorais. Nesse sentido investigações adicionais de mecanismos subjacentes envolvidos em vias

alternativas de angiogênese e invasibilidade dos gliomas são essenciais na compreensão e desenvolvimento de uma terapia mais eficaz.

Uma vez que a angiogênese é necessária para o crescimento tumoral proporcionando nutrientes e oxigênio além de remover resíduos das células cancerígenas, desde 1972 a terapia anti-angiogênica desperta interesse no tratamento do câncer ⁽¹²⁵⁾.

Devido à importância da via CXCR4/CXCL12 na gênese tumoral, o mecanismo de ação e a função do CXCR7 são intensamente investigados na atualidade para melhor compreensão do seu papel direta ou indiretamente na progressão tumoral e metastatização. Notavelmente, a expressão do CXCR7 em tumores cerebrais ainda tem sido pouco investigada, principalmente nos gliomas de baixo grau.

4 MÉTODOS

4.1 Análise prévias dos dados de *microarray* de oligonucleotídeos entre AGII e tecido cerebral NN

Os experimentos de *microarray* de oligonucleotídeos de AGII e de tecido cerebral NN foram realizados em plataforma CodeLink pelo grupo de Biologia Molecular e Celular do LIM-15 dentro de projeto temático coordenado por Suely Kazue Nagahashi Marie ⁽¹²⁶⁾.

O total de 55.000 genes foi avaliado em sete amostras de AGII em relação a três conjuntos de tecido cerebral NN (Anexo 1). Foram identificados 16 genes (Anexo 2) com uma expressão gênica na amostra tumoral cinco vezes maior ($T/N > 5$) em relação ao tecido NN ($p < 0,004$). Estes genes foram analisados através da base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. O gene *CXCR7* foi selecionado para estudos mais detalhados por preencher as seguintes características: localização preferencialmente na membrana celular; expressão também aumentada em outros tipos de tumores; existência de anticorpo comercialmente disponível; e, participação na angiogênese.

4.2 Amostras tumorais

Vinte e dois tecidos não neoplásico (NN) provenientes de cirurgia de epilepsia e 129 amostras de astrocitomas foram coletados durante procedimento cirúrgico pelo grupo de neurocirurgia do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas – Universidade de São Paulo.

Os tecidos foram congelados imediatamente após ressecção cirúrgica e mantidos em nitrogênio líquido até análise pela equipe do Laboratório LIM-15 durante a execução do Projeto Genoma Clínico e Projeto Temático sobre Tumores do Sistema Nervoso Central (projetos FAPESP # 01/12898-4 e 04/12133-6). Todos os pacientes assinaram consentimento informado para a doação do material biológico remanescente após a sua utilização para o estabelecimento do diagnóstico histopatológico para formação do biorepositório (Anexo 3). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (protocolo de pesquisa no 0243/09) (Anexo 4).

4.3 Caracterização demográfica

Registros dos pacientes submetidos à cirurgia entre 1998 e 2008 com diagnóstico de astrocitoma pelos critérios da OMS foram selecionados em banco de dados estruturados pelo grupo de pesquisa do LIM15. Dados clínicos incluindo idade, sexo, extensão da ressecção cirúrgica e índice de Karnofsky (KPS) foram coletados e os pacientes foram acompanhados ambulatorialmente a cada três meses. Os controles de neuroimagem foram realizados semestralmente.

Foi definido como tempo de sobrevida total o período entre a data da cirurgia até o óbito. O tempo de observação foi definido como o intervalo de tempo entre a data da cirurgia e a data obtida do óbito ou a data do último seguimento e/ou a data limite estabelecida neste estudo de 31 de dezembro de 2011.

4.4 Análise da expressão gênica

4.4.1 Extração de RNA

A qualidade dos tecidos obtidos foi analisada através de criocortes de 6 μm corados com Hematoxilina/Eosina. Áreas necróticas e de tecido normal foram microdissecadas previamente à extração de RNA de tecidos tumorais. O DNA e o RNA total de tecidos congelados foram extraídos com o uso do KitRNeasy MiniKit (QIAGEN, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante.

4.4.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição Reversa

A síntese de cDNA das amostras de tumor e controle foi realizada partindo-se de 1 μg de RNA total, utilizando enzima Superscript III (*SuperScript III Reverse Transcriptase* 200U/ μL ; Invitrogen, EUA), oligo dT e *randomprimers* (Invitrogen, EUA). Foi realizada inicialmente uma digestão com 3U de DNase (Roche, Suíça) para eliminar possível contaminação com DNA genômico, seguida de denaturação do RNA e pareamento dos *primers*, transcrição reversa, e digestão com RNase H para degradar as

fitas híbridas RNA:DNA. O cDNA foi diluído em TE (Tris/EDTA) na proporção 1:50, sendo as alíquotas armazenadas em freezer a -20°C até a sua utilização nas reações de análise de expressão gênica.

4.4.3 Desenho de *primers* para PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

As sequências FASTA, correspondentes ao RNAm dos genes, foram obtidas através da base de dados *Gene*, do NCBI. Com o propósito de se checar expressão gênica, os pares de *primers* foram desenhados de forma que o produto a ser amplificado estivesse no intervalo de pelo menos uma junção de *exon*. Para obter a posição das bases das junções, recorreu-se ao *Blat*, ferramenta do UCSC Genome Bioinformatics ⁽¹²⁷⁾. Além deste, os critérios utilizados para desenho dos *primers* foram: I) proximidade da extremidade 3' do gene, evitando-se produtos com distância maior que 3.000 pares de bases (*base pairs*, bp) da mesma; II) proporção CG em torno de 50% do total de bases; III) *primers* com tamanho entre 18-25bp; IV) temperatura de *melting* (Tm) entre 58 e 60°C, com diferença entre o Tm dos *primers* preferencialmente até 1°C; V) limite de 3 bases repetidas em sequência; VI) ausência de estruturas secundárias como *hairpins*, homo e heterodímeros; e VII) amplificação de um produto de tamanho entre 80-130bp. Todos estes critérios tiveram como objetivo garantir a eficiência e especificidade da reação. Para checagem de Tm, presença de estruturas secundárias e proporção CG, foi utilizado o programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems/EUA).

Os *primers* desenhados tiveram sua especificidade checada pelo *Blat* e *Blast*, do National Center for Biotechnology Information. As sequências de *primers* foram específicas para cada gene estudado (tiveram o mesmo RefSeq) e foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*, EUA) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência e concentração dos pares de *primers* para PCR em tempo real, tamanho do produto e eficiência da amplificação

	<i>Gene</i>	<i>Primers</i>		<i>Tamanho</i> pb	[] nM	<i>Eficiência</i>
		Sense 5'→3' (F)	Anti-sense 5'→3' (R)			
NORMALIZADORES	<i>HPRT</i>	F: TGAGGATTTGGAAAGGGTGT		118	200	100%
		R: GAGCACACAGAGGGCTACAA				
	<i>GUSβ</i>	F: GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT		101	400	98%
		R: CCGAGTGAAGATCCCCCTTTTTA				
	<i>TBP</i>	F: AGGATAAGAGAGCCACGAACCA		98	200	100%
		R: CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT				
	<i>CXCR7</i>	F: GGTCATTTGATTGCCCGCCT		93	200	107%
		R: GTTGCATGGCCAGCTGATGT				
	<i>CXCR4</i>	F: AATCTTCCTGCCACCATCTACT		110	200	92%
		R: CCGTCATGCTTCTCAGTTTCTTC				
	<i>IDH1</i>	F: GGCTTGTGAGTGGATGGGTAA		90	200	91%
		R: AGGCCAGGAACAACAAAATC				
	<i>HIF1α</i>	F: CATCCAAGAAGCCCTAACGTGT		117	200	87%
		R: CATTTTTCGCTTTCTCTGAGCAT				

4.4.4 PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

Amostras de cDNA da casuística foram testadas quanto aos níveis de expressão de RNAm do *CXCR7*, *CXCR4*, *HIF1α* e *IDH1* através da técnica de qRT-PCR. A seleção dos genes controles ou de referência endógena foi realizada segundo os critérios que incluem: níveis de expressão semelhantes em diferentes tipos celulares, ausência de comprometimento do gene com ciclo celular ou ativação celular e estabilidade comparável aos demais genes do estudo. Os dados quantitativos referentes à análise de

expressão na casuística foram normalizados relativamente à média geométrica de três genes de referência endógena: *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase* (HPRT), *TATA-box binding protein* (TBP) e beta glucuronidase (*GUSβ*), conforme descritos por Valente et al. ⁽¹²⁸⁾. As reações foram realizadas no aparelho ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) pelo método de incorporação de *Sybr Green* (Applied Biosystems).

A reação foi feita em um volume final 12μL, contendo 3μL de cDNA, 6μL de Power SYBR Green I Master Mix (Applied Biosystems) e 3μL de solução com par de *primers* em uma concentração final de 200-400nM, que foi otimizada para cada gene. (Tabela 2) Os parâmetros do aparelho foram ajustados de acordo com as condições universais determinada pelo fabricante, que são pré-aquecimento inicial de 50°C por 2 minutos, denaturação a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos para amplificação; seguidos de uma etapa final de curva de dissociação. A concentração mínima de *primers* foi determinada pelo *cycle threshold* (Ct) mais baixo e eficiência de amplificação máxima, minimizando amplificação inespecífica. As curvas de dissociação dos produtos de PCR foram analisadas para a certificação de picos únicos para todos os pares de *primers*. A amplificação específica de produto de PCR único foi confirmada através da análise de suas curvas de dissociação e através de corrida por eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio. Todas as amostras foram testadas em duplicatas, admitindo-se um desvio de até $\pm 0,4$ e, para cada gene em estudo, foram realizadas em paralelo reações controle sem cDNA.

Para todos os genes foram feitas curvas padrão de uma amostra de cDNA de pool de linhagens de GBM, com diluições seriadas. O cálculo de eficiência de amplificação foi realizado pela fórmula $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$.

4.4.5 Quantificação relativa de expressão gênica

As amostras foram testadas em duplicatas e considerou-se a média aritmética dos valores de Ct. A fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizada para calcular a expressão relativa dos genes que apresentaram amplificações com eficiência $E = 100 \pm 10\%$, onde $\Delta CT = Ct$ gene alvo – média geométrica dos Ct dos normalizadores (*GUSB*, *HPRT* e *TBP*) e $\Delta\Delta CT = \Delta Ct$ tumor – média ΔCt tecidos não tumorais ⁽¹²⁹⁾. Para eficiências menores que 90%, adotou-se a fórmula descrita por Pfaffi ⁽¹³⁰⁾ $1 + E^{-\Delta\Delta CT}$. Os valores maiores ou iguais a mediana foram considerados hiperexpressos e os valores menores que a mediana foram considerados hipoexpressos.

4.4.6 Status mutação *IDH1*

O status da mutação do *IDH1* em 105 amostras de astrocitomas, previamente determinado, foram obtidos do biorepositório de tumor mantido pelo LIM-15, Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo ⁽⁸⁹⁾.

4.5 Análise da expressão proteica por imuno-histoquímica

O procedimento imuno-histoquímico para a proteína do gene selecionado foi realizado em cortes de 4µm em lâminas de tecidos incluídos em parafina.

Para a detecção imuno-histoquímica do CXCR7, secções de tecido foram processadas e submetidas à recuperação antigênica. As lâminas foram imersas em tampão citrato 10mM, pH 6,0, e incubadas a 122°C por 4 minutos utilizando aquecedor elétrico pressurizado (BioCare Medical, Walnut Creek , USA). As amostras foram então

bloqueadas e posteriormente incubadas com os anticorpos primários, na diluição final de 1:200, em temperatura 16°C - 20°C por 16 horas. A reação foi revelada utilizando kit comercial (Novolink, Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK) utilizando diaminobenzidina em temperatura ambiente e hematoxilina de Harris para a coloração nuclear.

Foi realizada análise semiquantitativa (percentagem de estruturas marcadas) e qualitativa (intensidade da reação) da expressão da proteína obtida por reação imuno-histoquímica. A análise foi feita por dois observadores independentes (SKNM e AMB), conforme aos seguintes critérios. Análise semiquantitativa: (-) negativo; (+) até 25% das estruturas marcadas; (++) 26 a 50% das estruturas marcadas; (+++) 51 a 75% das estruturas marcadas; e, (+++++) mais de 75% das estruturas marcadas. Análise qualitativa da intensidade da marcação: (+) fraco; (++) moderado; e, (+++) intenso.

4.6 Imunofluorescência

A reação foi realizada em linhagem de células U87MG fixadas com formalina a 10%. Depois de lavagens sucessivas com Tween 0,05% (Merck, Darmstadt, Germany) diluído em PBS, as células foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de soro de cabra (Sigma), 0,3% tritonX-100 (Sigma), e PBS durante 1h à temperatura ambiente em um agitador. As células foram então incubadas com anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio a 48°C durante 24h. Após este período, os cortes foram lavados novamente cinco vezes com PBS-Tween e incubados por mais 24h à 48°C com anticorpos secundários diluídos em 0,3% Triton X-100 em PBS, com a introdução de 40,6-diamidinas-2-fenilindol dicloridrato (DAPI) (Sigma, USA) a 1:10.000 para coloração nuclear. Foi utilizado o anticorpo primário CXCR7 (diluição 1:600, abcam®/EUA) e o anticorpo secundário anti-rato AlexaFluor 594 (Molecular Probes/EUA)

em diluição a 1:200. Os núcleos foram corados utilizando dicloridrato de 40,6-diamidinas-2-fenilindol (Sigma, 1:10.000).

As imagens foram obtidas em TCS Leica SP2 sistema confocal (Munique) (405nm diodo, ARKR 488 nm, 594nm, Ar, lasersXn 633nm) usando os 20x0.7 ou 63x1.2 objectivas, com ajustamento automático do orifício para se obter um *airyunit* de 1 para garantir confocalidade máxima. O tecido foi digitalizado em uma espessura de 2 mm e as imagens foram digitalizadas em 2048x2048 *pixels*, salvos em formato “.tiff”.

4.7 Análise estatística

O teste de normalidade de expressão e tempo de observação Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificação da distribuição dos dados de expressão e tempo observacional. A análise estatística da distribuição da expressão relativa dos quatro genes estudados na casuística (NN e AG) foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido da comparação de Dunn. A significância estatística foi estabelecida quando $p < 0,05$.

A expressão associada entre os genes estudados foi realizada através da Correlação de Pearson para amostras com distribuição paramétrica e Spearman-rho, para amostras com distribuição não paramétrica. O coeficiente de correlação $r \geq 0,7$ foi interpretado como forte correlação, um coeficiente $0,3 \leq r < 0,7$ como correlação moderada e $r < 0,3$ como correlação fraca. Valores positivos de r referem-se a grandezas proporcionais, enquanto valores negativos foram interpretados como grandezas inversamente proporcionais.

Curvas de sobrevida foram feitas segundo método de Kaplan-Meier e as diferenças na sobrevida analisadas com relação significância pelo teste *log-rank*.

Todos os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do programa SPSS 20 (IBM, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização demográfica

Este estudo consistiu de 129 casos de astrocitomas difusamente infiltrativos e 22 casos de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de epilepsia. A tabela 2 mostra os resultados demográficos do estudo.

Tabela 2. Dados demográficos dos pacientes analisados neste estudo

	AGII		AGIII		GBM	
	n	%	n	%	n	%
Total casos	25	100	18	100	86	100
Idade mediana (anos)	34±8,1		35±12,3		54±13,9	
Sexo						
Masculino	13	52%	11	61%	58	67%
Feminino	12	48%	7	39%	28	33%
Karnofsky (diagnóstico)	100		90		90	

5.2 Análise da expressão gênica do *CXCR7*, *CXCR4*, *HIF1 α* e *IDH1*

Análise da expressão gênica do *CXCR7*, *CXCR4*, *HIF1 α* e *IDH1* por quantificação em PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada em uma casuística de 25 amostras de AGII, 18 AGIII e 86 GBM em relação a expressão em 22 amostras de tecido cerebral NN (Anexo 6).

Houve diferença significativa nos níveis de expressão do *CXCR7* entre os astrocitomas e o tecido cerebral NN ($p<0,0001$), bem como nos níveis de expressão do *CXCR4*, *HIF1 α* e *IDH1* entre os astrocitomas e o tecido cerebral não neoplásico ($p<0,0001$) (Tabela 3).

Tabela 3. Expressão mediana dos genes em relação às amostras de astrocitoma

Gene	Expressão mediana				Teste de Dunn
	NN	AGII	AGIII	GBM	<i>p</i>
<i>CXCR7</i>	20,68	70,24	72,89	92,48	$p<0,0001$
<i>CXCR4</i>	19,86	53,48	82,67	95,51	$p<0,0001$
<i>IDH1</i>	16,62	56,32	83,56	95,33	$p<0,0001$
<i>HIF1α</i>	15,00	56,64	102,33	91,72	$p<0,0001$

Observou-se níveis de expressão do *CXCR7* maiores nas amostras de astrocitomas em relação ao tecido cerebral NN, também observado em relação aos níveis de *CXCR4*, *IDH1* e *HIF1 α* , cujos níveis de expressão foram maiores nas amostras de astrocitomas em relação tecido NN (Figuras 9 a 12).

Houve também diferença significativa nos níveis de expressão do *CXCR4* entre as amostras de AGII e AGIII ($p = 0,0224$) e entre AGII e GBM ($p = 0,0010$); do *IDH1* entre as amostras de AGII e AGIII ($p = 0,0331$) e entre AGII e GBM ($p = 0,0023$); e, do *HIF1 α* entre as amostras de AGII e AGIII ($p = 0,0004$) e entre AGII e GBM ($p = 0,0061$).

Figura 9. Níveis de expressão do Rnam de *CXCR7* analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR

Figura 10. Níveis de expressão do RNAm de *CXCR4* analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR

Figura 11. Níveis de expressão do RNAm de *IDH1* analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR

Figura 12. Níveis de expressão do RNAm de *HIF1 α* analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR

5.2.1 Expressão associada dos genes estudados nos astrocitomas grau II

As expressões gênicas de *CXCR7*, *CXCR4*, *IDH1* e *HIF1 α* foram analisadas quanto à expressão associadas dos genes estudados em combinação dois a dois (Tabela 4). Nos astrocitomas grau II não se observou correlação entre os níveis de expressão de *CXCR7* e *HIF1 α* ($r = 0,430$ $p = 0,032$). Observou-se correlação moderada entre os níveis de expressão de *CXCR7* e *IDH1* ($r = 0,520$ $p = 0,008$) e entre os níveis de expressão de *CXCR7* e *CXCR4* ($r = 0,410$ $p = 0,042$) (Tabela 4 e Figura 13).

Tabela 4. Expressão associadas dos genes analisados em combinação dois a dois nos AGII. Spearman's rho

	<i>CXCR7</i>	<i>CXCR4</i>	<i>HIF1α</i>	<i>IDH1</i>
<i>CXCR7</i>	r=1	r=0,410 p=0,042	r=0,128 p=0,541	r=0,520 p=0,008
<i>CXCR4</i>	r=0,410 p=0,042	r=1	r=0,430 p=0,032	r=0,444 p=0,026
<i>HIF1α</i>	r=0,128 p=0,541	r=0,430 p=0,032	r=1	r=0,398 p=0,049
<i>IDH1</i>	r=0,520 p=0,008	r=0,444 p=0,026	r=0,398 p=0,049	r=1

Figura 13. Correlação da expressão associada nos AGII. (A) CXCR7/CXCR4; (B) CXCR7/HIF1 α ; (C) CXCR7/IDH1; (D) CXCR4/HIF1 α ; (E) HIF1 α /IDH1 e (F) CXCR4/IDH1

5.2.2 Expressão associada dos genes estudados nos glioblastomas

Observou-se correlação moderada entre os níveis de expressão de *CXCR7* e *CXCR4* ($r = 0,334$ $p < 0,002$), correlação fraca entre os níveis de expressão de *CXCR7* e *HIF1 α* ($r = 0,285$ $p < 0,008$) e correlação moderada entre os níveis de expressão de *CXCR7* e *IDH1* ($r = 0,503$ $p < 0,0001$) nos GBM (Tabela 5 e Figura 14).

Tabela 5. Expressão associada dos genes analisados em combinação dois a dois nos GBM. Spearman's rho

	<i>CXCR7</i>	<i>CXCR4</i>	<i>HIF1α</i>	<i>IDH1</i>
<i>CXCR7</i>	r=1	r=0,334 p=0,002	r=0,285 p=0,008	r=0,503 p<0,001
<i>CXCR4</i>	r=0,334 p=0,002	r=1	r=0,539 p<0,001	r=0,338 p=0,001
<i>HIF1α</i>	r=0,285 p=0,008	r=0,539 p<0,001	r=1	r=0,428 p<0,001
<i>IDH1</i>	r=0,503 p<0,001	r=0,338 p=0,001	r=0,428 p<0,001	r=1

Figura 14. Correlação da expressão associada nos GBM. (A) CXCR7/CXCR4; (B) CXCR7/HIF1 α ; (C) CXCR7/IDH1; (D) CXCR4/HIF1 α ; (E) HIF1 α /IDH1 e (F) CXCR4/IDH1

5.2.3 Expressão relativa do *CXCR7* e *CXCR4* em relação à expressão do *HIF1α* nos astrocitomas difusamente infiltrativos

Os pacientes com hipoexpressão do *HIF1α* tiveram uma expressão relativa mediana do *CXCR7* de 5,25 e do *CXCR4* de 6,54, menor em relação aos pacientes com hiperexpressão do *HIF1α* que apresentaram expressão relativa mediana do *CXCR7* de 7,94 e *CXCR4* de 16,32 (Figura 15).

Figura 15. Expressão relativa mediana do *CXCR7* e *CXCR4* em relação expressão *HIF1α*: (-) hipoexpresso e (+) hiperexpresso ($p = 0,001$)

5.2.4 Expressão relativa do *CXCR7*, *CXCR4* e *HIF1 α* em relação ao status de mutação de *IDH1*

A análise da mutação do *IDH1* foi realizada em 105 amostras de astrocitomas difusamente infiltrativos (19 AGII, 12 AGIII e 74 GBM). A mutação R132H foi detectada em 30 amostras sendo distribuída da seguinte forma: 16 AGII, 6 AGIII e 8 GBM. Os pacientes com mutação apresentaram prognóstico mais favorável ($p < 0,001$ – *log rank*).

A expressão relativa mediana do *CXCR7* nos pacientes com mutação do *IDH1* foi de 4,26 enquanto aqueles sem a mutação foi de 5,90 ($p = 0,0096$) (Figura 16).

Figura 16. Níveis de expressão RNAm *CXCR7* em relação ao status de mutação do *IDH1*

A expressão relativa mediana do *CXCR4* nos pacientes com mutação do *IDH1* foi de 4,66 enquanto aqueles sem mutação foi de 13,23 ($p = 0,0005$) (Figura 17).

Figura 17. Níveis de expressão RNAm *CXCR4* em relação ao status de mutação do *IDH1*

A expressão relativa mediana do *HIF1 α* nos pacientes com mutação do *IDH1* foi de 5,66 enquanto aqueles sem mutação foi de 4,61 ($p = 0,346$) (Figura 18).

Figura 18. Níveis de expressão RNAm *HIF1 α* em relação ao status de mutação do *IDH1*

Visão geral do estado mutação *IDH1* e a expressão gênica de *CXCR7*, *CXCR4*, *HIF1 α* e *IDH1* são demonstrada em *heatmap* (Figura 19).

Figura 19. Heatmap demonstrando a expressão relativa dos genes nos astrocitomas em relação estado de mutação *IDH1*. Amostras de *IDH1* mutado (preto) e *IDH1* selvagem (cinza). Expressão gênica – hiperexpresso (vermelho) e hipoexpresso (verde)

5.3 Expressão proteica do CXCR7

A análise da expressão protéica do CXCR7 foi realizada por imuno-histoquímica na casuística de 6 AGII, 6 AGIII e 7 GBM, em amostras de parafina em relação a 6 amostras de tecido cerebral NN..

A expressão proteica do CXCR7 foi identificada em todas as amostras estudadas. A intensidade da expressão aumentou conforme a grau de malignidade dos astrocitomas. Os AGII apresentaram marcação celular fraca e quase nenhuma marcação no endotélio da vascularização tumoral. Identificou-se uma marcação proteica mais intensa ao nível citoplasmático à medida do incremento da malignização histopatológica, além de uma reação endotelial progressivamente mais forte atingindo maior intensidade nos GBM (Figura 20).

Figura 20. Fotomicrografias com expressão da proteína CXCR7 por imunohistoquímica. (A) Amostra tecido cerebral NN com marcação nuclear mas não citoplasmática e ausência de marcação endotelial. (B) AGII: células tumorais com marcação predominantemente citoplasmática e fraca marcação no endotélio tumoral. (C) AGIII: células tumorais em maior densidade apresentando maior marcação nuclear e citoplasmática e moderada marcação no endotélio tumoral. (D) GBM: células tumorais apresentando grande atipia celular e nuclear, mais desdiferenciadas, com forte marcação citoplasmática e nuclear, e também forte marcação no endotélio tumoral proliferado. (IHQ 400x)

5.4 Imunofluorescência

Observou-se na reação realizada em linhagem de células estabelecidas de GBM (U87MG) uma expressão proteica preferencial no citoplasma com mínima marcação nuclear. Através da análise da microscopia confocal foi possível identificar uma marcação também na membrana plasmática de aspecto granular (Figura 21).

Figura 21. Expressão proteica de CXCR7 por imunofluorescência em células da linhagem U87MG de glioblastoma demonstrando marcação fluorescente em verde de CXCR7 no citoplasma celular e alguns poucos núcleos com granulação fluorescente também no núcleo. Evidencia-se marcação inequívoca granular de CXCR7 na membrana plasmática da células em cortes celulares confocais. Os núcleos apresentam-se contra-corados com DAPI em azul. (63x)

5.5 Análise da expressão gênica do *CXCR7* e sobrevida geral dos pacientes com GBM

Nos pacientes com GBM a sobrevida mediana dos pacientes com GBM apresentando *CXCR7*⁺ foi de 8 meses (IC 95%, 4,3 – 13,7 meses) e os pacientes com *CXCR7* apresentaram sobrevida de 9 meses (IC 95%, 6,8 – 9,9 meses), não se observando, portanto diferença estatística ($p = 0,798 - \log \text{rank}$). (Figura 22)

Figura 22. Kaplan Meyer dos pacientes com GBM em relação ao nível de expressão do *CXCR7*

5.6 Análise da expressão gênica do *CXCR4* e sobrevida geral dos pacientes com GBM

Nos pacientes com GBM a sobrevida mediana dos pacientes com *CXCR4*⁺ foi de 11 meses (IC 95%, 7,8 – 14,1 meses) e dos pacientes com *CXCR4*⁻ foi de 7 meses (IC 95%, 4,8 – 9,2 meses), não havendo igualmente diferença significativa ($p = 0,284$ – log rank) (Figura 23).

Figura 23. Kaplan Meyer dos pacientes com GBM em relação ao nível de expressão do *CXCR4*

5.7 Análise da expressão gênica combinada do *CXCR7*/*CXCR4* e sobrevida geral dos pacientes com GBM

Entre os pacientes com GBM 25 (29%) apresentaram hiperexpressão simultânea de *CXCR7* e *CXCR4* e 24 (28%) hipoexpressão simultânea. A sobrevida mediana dos *CXCR7*⁺/*CXCR4*⁺ foi de 8 meses (IC 95%, 3,6 – 12,4 meses) e dos *CXCR7*⁻/*CXCR4*⁻ foi de 5 meses (IC 95%, 0,7 – 9,3 meses) sem diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,407$ – log rank) (Figura 24).

Figura 24. Kaplan Meyer dos pacientes com GBM em relação ao nível de expressão combinada do *CXCR7* e *CXCR4*

6 DISCUSSÃO

O estroma tumoral tem-se revelado cada vez mais relevante no processo tumorigênico e os seus diversos componentes têm sido foco de estudo como potenciais alvos terapêuticos adjuvantes. Os resultados do presente estudo demonstraram que os receptores de quimiocinas, *CXCR7* e *CXCR4*, apresentam expressão diferencial nos astrocitomas difusamente infiltrativos e suas expressões associadas com outros fatores como *HIF1 α* e *IDH1* podem favorecer o processo de malignização tumoral.

6.1 Expressões relativas de *CXCR7* e *CXCR4* aumentam com o grau de malignidade nos astrocitomas difusamente infiltrativos

Os níveis de expressão tanto de *CXCR7* como de *CXCR4* mostraram-se significativamente aumentados em astrocitomas em relação ao tecido cerebral não neoplásico e observou-se também um incremento significativo em paralelo ao grau de malignidade. Adicionalmente, observou-se expressões associadas significativas de *CXCR7* e *CXCR4* nos AGII ($r = 0,41$; $p = 0,042$) e nos GBM ($r = 0,33$; $p = 0,002$). Estes achados corroboram as descrições prévias na literatura como discutidos a seguir.

O *CXCR4* é o receptor de quimiocina mais frequentemente hiperexpresso e melhor caracterizado em células tumorais e, também, o único receptor de quimiocina presente em células precursoras tumorais tendo sido identificado em GBM ⁽¹³¹⁾ e adenocarcinoma de pâncreas ⁽¹³²⁾. A interação *CXCR4/CXCL12* apresenta papel

importante na proliferação, sobrevivência, invasão e metastatização de diversos tipos de tumores.

O CXCR7, recém descoberto segundo receptor da CXCL12, vem recebendo especial atenção por participar do desenvolvimento de diferentes tumores, contudo poucas informações estão disponíveis sobre a sua ocorrência nos astrocitomas difusos.

Quando descoberto, evidenciou-se que o CXCR7 não ativa a via clássica de sinalização dos GPCR. Uma das funções propostas seria a remoção da CXCL12 gerando um gradiente de quimiocina que levaria uma sinalização diferencial pelo CXCR4 ⁽¹³³⁾. Outro modo de ação do CXCR7 seria através da formação de um heterodímero com CXCR4 promovendo uma alteração conformacional do receptor anulando a sinalização ⁽¹³⁴⁾. Alguns estudos demonstraram que CXCR7 interage com β -arrestina de uma maneira ligante-dependente e sinaliza como um receptor endógeno ativando *in vivo* a via MAP-kinase/Akt em astrócitos, células de Schwann de camundongos e em linhagens de GBM humano ^(11,135,136). Mais recentemente foi demonstrado que o CXCR7 sinaliza sim através da proteína G e promove a mobilização do cálcio através da ligação do CXCL12 em astrócitos de camundongos na ausência de CXCR4 ⁽¹³⁷⁾. CXCL11, o segundo ligante do CXCR7, também pode ativar a via MAP-kinase/Akt e apresenta propriedade quimiotática em células de músculo liso vasculares ^(136,138).

Outros estudos têm identificado a relação do CXCR7, CXCR4 e seu ligante CXCL12 com dados clínicos e histopatológicos em neoplasias, bem como sendo fator preditivo de prognóstico ^(26-28,56,107).

O CXCR7 é altamente expresso em tumores de próstata e a intensidade da marcação protéica está relacionada com a agressividade tumoral ⁽²⁶⁾. Em câncer de mama o CXCR7 aumenta a capacidade de disseminação celular e metastatização pulmonar e cerebral ^(30,139). No pulmão a expressão do CXCR7 está relacionada com

metástase mais precoce e recorrente ⁽¹⁴⁰⁾. Em carcinoma hepatocelular o *CXCR7* regula invasão celular, crescimento tumoral e angiogênese ⁽¹⁴¹⁾. Expressão concomitante do *CXCR4* e *CXCR7* é fator preditivo de pior prognóstico em pacientes com carcinoma de células renais ⁽²⁸⁾. A expressão de *CXCL12* está relacionada com menor sobrevida e menor tempo livre de recorrência de doença independentemente do tamanho da lesão, diferenciação e do comprometimento linfonodal ⁽¹⁴²⁾. Em carcinoma de células renais pacientes com hiperexpressão *CXCR4*, *CXCR7* e *CXCL12* apresentaram menor sobrevida e menor tempo livre de recorrência ⁽¹⁴³⁾.

6.2 A expressão proteica de CXCR7 nas células endoteliais, assim como nas células tumorais, foi crescente com o incremento da malignidade em astrocitomas

As células endoteliais apresentaram uma expressão aumentada de *CXCR7*, com aumento progressivo de acordo com o grau de malignidade do astrocitomas. Desta forma, observou-se uma marcação de *CXCR7* predominante nas células tumorais e quase nenhuma no endotélio da vascularização tumoral nos astrocitomas de baixo grau (AGII). Enquanto nos GBM a marcação mais intensa ocorreu principalmente nas células em pseudopaliçadas adjacentes às áreas de necrose e fortemente no endotélio tumoral proliferado. Estes dados sugerem um aumento da expressão proteica do *CXCR7* conforme o grau de malignidade nos astrocitomas, além de uma marcação no endotélio tumoral progressivamente mais intensa com o incremento da malignidade, sugerindo um papel na angiogênese. Resultados semelhantes são encontrados em dados da literatura de outros tumores como bexiga ⁽²⁹⁾, pâncreas ⁽²⁷⁾ e rins ⁽¹⁴⁴⁾. Porém diferem

parcialmente dos disponíveis em gliomas na literatura, onde em um estudo o CXCR7 foi encontrado principalmente nas células endoteliais de cérebro normal e particularmente nas células tumorais de GBM ⁽¹¹⁾; e, em outro estudo, o CXCR7 estava presente nas células tumorais e fracamente no endotélio de GBM. Adicionalmente, nenhuma marcação foi identificada em glioma de baixo grau ⁽³¹⁾. A inconsistência dos dados em relação a localização do CXCR7 pode ser justificada devido ao reduzido número de amostras analisadas nestes estudos prévios; diferentemente do observado em um estudo de câncer de colo de útero onde o CXCR7 estava relacionado com tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos e tempo livre de doença ⁽¹⁴⁵⁾.

Os nossos achados estão também de acordo com os resultados de modelo animal de Hattermann et al. ⁽¹¹⁾, onde os autores demonstraram *in vivo* que o CXCR7 é altamente expresso em gliomas, frequentemente presente nas células endoteliais do tumor e na micróglia; além de estar relacionado com o grau de malignidade. Demonstrou também que o CXCR4 é mais expresso em células precursoras tumorais enquanto o CXCR7 é mais abundante em células tumorais diferenciadas. Interessantemente células endoteliais de GBM apresentam hiperexpressão CXCR7 e CXCL12 e não de CXCR4 ⁽¹²²⁾.

Similarmente, os nossos achados nas células de linhagem tumoral de GBM, U87MG, mostram de maneira inequívoca a presença de CXCR7 na membrana celular, assim como no citoplasma e uma tênue marcação também no núcleo de algumas das células tumorais. Desta forma, é possível especular que este receptor de membrana celular é internalizado e há um tráfego desta proteína para o núcleo, corroborado pela observação de marcação nuclear nas amostras cirúrgicas. Descrição de tráfego similar da superfície celular para o núcleo foi descrito para EGFR ^(146–148), podendo-se inferir, por analogia de mecanismos similares para o CXCR7. Esta observação merece ser investigada em maior profundidade em estudos posteriores.

6.3 As expressões de *CXCR4/CXCR7* se associam à expressão de *HIF1α* particularmente em GBM

Interessantemente, as expressões de *CXCR7* e *CXCR4*, de modo mais significativo de *CXCR4* se associam à expressão de *HIF1α* em GBM. O mesmo não ocorre em astrocitoma de baixo grau (AGII). Estes achados permitem especular que a hipóxia, mais relevante em GBM, ativa a expressão de *HIF1α* e este modula as expressões de *CXCR4* e *CXCR7*, ambos relacionados com o processo da angiogênese, uma alteração marcante em GBM. A expressão aumentada de *CXCR7* no endotélio tumoral de GBM, demonstrada no presente estudo, deve contribuir para este processo de angiogênese.

Tem sido bem documentado que a ativação do HIF-1, também influenciada pela mutação *IDH1*, pode induzir a expressão local de fatores angiogênicos, incluindo o CXCL12, e consequentemente aumentar o recrutamento de múltiplas populações de células derivadas da medula óssea através do *CXCR4* ^(7,85,149,150).

6.4 A presença de mutação no *IDH1* associa-se a uma menor expressão de *CXCR7* e *CXCR4*

Observou-se no presente estudo forte correlação da presença da mutação do *IDH1* com o grau de malignidade dos astrocitomas. A mutação R132H estava presente em 84% dos AGII, 50% dos AGIII e 10% dos GBM. Os pacientes com mutação do *IDH1* apresentaram um melhor prognóstico, em conformidade aos resultados previamente já descritos ^(39,84,151). Importante ressaltar que os pacientes com a mutação do *IDH1* apresentaram uma expressão significativamente reduzida de ambos os receptores *CXCR7*

e *CXCR4*. A presença da mutação não demonstrou influência significativa na expressão do *HIF1 α* , corroborando resultado prévio de imuno-histoquímica de que a mutação R132H não é suficiente para aumentar a expressão HIF ⁽¹⁵²⁾. Similarmente, a relação entre o estado da mutação do *IDH1* com o nível de ativação pelo *HIF1 α* já havia sido questionada previamente na literatura ⁽¹⁵⁷⁾.

A inibição das dioxigenases dependentes de α -KG pela 2HG é o mecanismo primário proposto da gênese tumoral mediada pela mutação do *IDH1*. Estas enzimas apresentam diversas funções que modulam uma série de programas celulares que incluem sensibilização à hipóxia, demetilação das histonas e do DNA, metabolismo dos ácidos graxos e modificações do colágeno ⁽¹⁵³⁾. Por outro lado, a indução de um fenótipo metilado oferece a base molecular para resposta terapêutica com o agente alquilante temozolamida ⁽¹⁵⁴⁾. Além disso, recentemente foi demonstrado, em gliomas de baixo grau, que a combinação *IDH* mutado e *MGMT* metilado apresenta impacto favorável na sobrevida, bem como a tripla combinação com perda de heterozigosidade (LOH) de 1p/19q. Enquanto a combinação *IDH* mutado, *MGMT* metilado e imunopositividade nuclear TP53 apresentou fator de risco significativo para transformação maligna ⁽¹⁵¹⁾. Não se observou impacto clínico, em termos de sobrevida ou de tempo de observação relacionados aos diversos parâmetros de expressão gênica dos alvos analisados e ao status de mutação do *IDH1*. Uma extensão deste estudo será necessária com ampliação da casuística para uma reanálise destas variáveis no aspecto clínico.

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que há um incremento das expressões de *CXCR7* e *CXCR4* já no início da progressão maligna dos astrocitomas difusamente infiltrativos, uma vez que a hiperexpressão ocorre nos astrocitomas de baixo grau (AGII) em relação ao tecido cerebral não neoplásico. Especula-se que a hiperexpressão destes dois alvos receba uma modulação do *HIF1 α* quando advém a hipóxia nos GBM, havendo uma convergência destes fatores para o estímulo da angiogênese, uma alteração preponderante em GBM. As expressões

associadas significativas destes fatores (*CXCR7/CXCR4/HIF1 α*) e a expressão proteica aumentada de *CXCR7* tanto nas células tumorais quanto no endotélio em GBM justificam esta especulação mecanística. A presença de mutação *IDH1*, por outro lado, modula para um menor aumento dessas expressões de *CXCR7* e *CXCR4*, eventualmente por fenômenos epigenéticos, com menor estímulo para a angiogênese e neste contexto possa se explicar o melhor prognóstico dos pacientes com este tipo de mutação. Os resultados ora demonstrados estão contextualizados em uma proposta de hipótese mecanística para progressão tumoral dos astrocitomas difusamente infiltrativos (Figura 25).

Figura 25. Diagrama ilustrando as possíveis relações entre os receptores CXCR7 e CXCR4 e a mutação IDH1 e a expressão HIF1 α . A enzima IDH1 normalmente catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato em α -KG que apresenta papel importante na degradação do HIF1 α . A mutação do IDH1 exibe um ganho de função, catalisa a produção de 2-HG. Elevados níveis deste oncometabólito inibe as dioxigenases dependentes de α -KG. A inibição das TET2 hidroxilase e histona demetilase provavelmente proporciona um aumento da hipermetilação do DNA. Induz um fenótipo metilador que pode exercer um efeito epigenético inibitório nos receptores CXCR7/CXCR4. A 2-HG influencia o HIF, em determinadas condições (hipóxia), inibindo as prolin hidroxilases com consequente aumento dos níveis de HIF1 α , que através da ligação com os elementos responsivos de hipóxia (HRE) induz a atividade transcripcional de genes alvo. Os efeitos biológicos dos CXCR7/CXCR4 são mediados pela ativação de GPCRs e consequente ativação das vias PI3K, MAPK, Akt e PKA

7 CONCLUSÕES

O *CXCR7* é um gene diferencialmente expresso em astrocitomas difusamente infiltrativos em relação tecido cerebral não neoplásico.

O nível de expressão do *CXCR7* associa-se significativamente com os níveis de expressão do *CXCR4* e *IDH1* nos AGII e com *CXCR4*, *HIF1a* e *IDH1* nos GBM.

Nível de expressão elevado do *CXCR7* e *CXCR4* correlaciona-se com nível elevado de expressão de *HIF1a*, enquanto a presença da mutação do *IDH1* está associada com níveis inferiores de *CXCR7* e *CXCR4*.

Os níveis de expressão proteica do *CXCR7* correlacionam-se com o grau de malignidade dos astrocitomas difusamente infiltrativos.

A localização da proteína é preferencialmente de membrana celular havendo uma maior intensidade de marcação no endotélio da vascularização tumoral com aumento da malignidade.

A expressão *CXCR7* e *CXCR4* não apresentou associação significativa com o dado clínico de sobrevida geral.

8 ANEXOS

Anexo 1

Tabela experimentos microarray em sete amostras astrocitoma grau II em relação três pools tecido cerebral não neoplásico (T/N >5)

ACC#	Probe_Name	astroc II 267/MEDIA POOL	astroc II 341/MEDIA POOL	astroc II 392/MEDIA POOL	astroc II 452/MEDIA POOL	astroc II 1095/MEDIA POOL	astroc II 1113/MEDIA POOL	astroc II 1155/MEDIA POOL	mean ratio	log2meanratio	mean ratio	Pvalue
AA917807.1	GE602585	209,7132	172,8953	209,7132	213,6686	144,5976	112,8639	160,8571	174,90	7,45	174,90	0,004777
AI656616.1	GE490249	71,9692	29,3791	71,9692	61,2982	25,9532	39,5046	32,6049	47,53	5,57	47,53	0,000599
AW962980.1	GE645271	60,6852	27,6803	60,6852	56,2629	20,5167	24,1718	31,4787	40,21	5,33	40,21	0,000491
NM_174981.2	GE560501	66,2566	30,1691	66,2566	26,6525	17,0972	11,7382	19,3319	33,93	5,08	33,93	0,004171
BM811335.1	GE492456	44,1322	34,9213	44,1322	60,0295	25,4151	4,6737	10,8227	32,02	5,00	32,02	0,003491
AI563973.1	GE577329	20,4121	25,5745	20,4121	28,0835	25,3848	20,6073	5,1021	20,80	4,38	20,80	0,001051
BX110350.1	GE549273	23,6639	12,2363	23,6639	24,6325	33,6203	18,5772	7,3060	20,53	4,36	20,53	0,001706
AW510771.1	GE789675	23,0855	15,0301	23,0855	27,4928	3,5929	13,6467	15,6112	17,36	4,12	17,36	0,004068
BG434471.1	GE537715	12,6584	15,3575	12,6584	29,0885	20,0521	8,5329	19,9968	16,91	4,08	16,91	0,000326
NM_006059.2	GE58389	14,9825	13,4905	14,9825	6,3344	12,1504	15,6978	18,5726	13,74	3,78	13,74	0,000106
AI937359.1	GE526828	5,0924	5,4975	5,0924	5,5738	20,5412	13,6516	12,1108	9,65	3,27	9,65	0,004352
NM_002167.2	GE80828	6,7054	4,2441	6,7054	5,3986	17,7831	13,4310	11,9293	9,46	3,24	9,46	0,002009
AA470586.1	GE767593	5,9979	10,3778	5,9979	3,7698	14,6117	11,0908	12,9361	9,25	3,21	9,25	0,000831
NM_080861.3	GE87621	15,8230	10,5983	15,8230	8,9873	3,0403	4,3403	4,6748	9,04	3,18	9,04	0,003481
NM_152669.1	GE535426	3,3582	8,9352	3,3582	9,8234	9,5904	10,3073	9,6493	7,86	2,97	7,86	0,000501
CK819299.1	GE864534	13,5772	5,6370	13,5772	6,4960	5,6876	3,1862	6,3378	7,79	2,96	7,79	0,004220
NM_000237.1	GE79485	6,9655	13,5302	6,9655	8,1948	9,2367	2,3821	5,7956	7,58	2,92	7,58	0,000886
AI939631.1	GE511984	4,6153	8,4365	4,6153	4,7095	15,8258	6,4386	7,1512	7,40	2,89	7,40	0,002518
NM_005795.2	GE57788	4,6464	5,0959	4,6464	4,6911	11,9186	14,6350	5,9256	7,37	2,88	7,37	0,003102
W79578.1	GE542316	8,7799	11,0511	8,7799	5,7305	3,9170	8,4596	3,8061	7,22	2,85	7,22	0,000437
NM_006636.2	GE79728	3,9634	3,9086	3,9634	7,0455	11,0817	13,2602	6,2980	7,07	2,82	7,07	0,002408
AI540165.1	GE499715	9,3366	7,1519	9,3366	13,7700	3,0799	2,7413	4,0584	7,07	2,82	7,07	0,003451
AW445193.1	GE843201	10,3728	8,4222	10,3728	7,4232	2,9821	3,6310	5,3249	6,93	2,79	6,93	0,000842
NM_182626.1	GE546218	8,9323	10,6406	8,9323	11,0348	4,3273	2,1223	2,2056	6,89	2,78	6,89	0,003248

Continua...

Conclusão do Anexo 1

ACCN#	Probe_Name	astroc II 267/MEDIA POOL	astroc II 341/MEDIA POOL	astroc II 392/MEDIA POOL	astroc II 452/MEDIA POOL	astroc II 1095/MEDIA POOL	astroc II 1113/MEDIA POOL	astroc II 1155/MEDIA POOL	mean ratio	log2meanratio	mean ratio	Pvalue
AL049443.1	GE56181	6,5304	5,3337	6,5304	12,2517	7,4814	5,7945	3,2661	6,74	2,75	6,74	0,000708
AK001117.1	GE521556	6,1383	8,1118	6,1383	10,8551	4,2507	5,3197	6,0178	6,69	2,74	6,69	0,000839
NM_012260.1	GE58477	10,1537	7,5093	10,1537	3,6999	6,9850	5,6557	2,3716	6,65	2,73	6,65	0,001033
BF594228.1	GE489867	8,2242	9,1567	8,2242	3,2614	6,0020	5,4605	5,5296	6,55	2,71	6,55	0,000127
AW449273.1	GE870401	3,8587	3,9654	3,8587	3,2377	13,1909	8,2094	7,9628	6,33	2,66	6,33	0,004188
NM_005461.3	GE58365	8,6413	2,1693	8,6413	7,8144	3,5887	8,3362	4,7672	6,28	2,65	6,28	0,000865
NM_003107.2	GE59973	5,2871	5,9157	5,2871	3,0353	9,0432	6,7823	8,3497	6,24	2,64	6,24	0,000164
AF414442.2	GE82902	3,1457	5,0847	3,1457	7,0870	7,6792	10,3564	6,5227	6,15	2,62	6,15	0,001491
BX110274.1	GE512759	8,9540	5,2019	8,9540	6,2815	3,6165	4,6291	4,8220	6,07	2,60	6,07	0,000752
BU854460.1	GE604868	7,6089	2,2913	7,6089	6,4848	4,1302	7,2066	6,9460	6,04	2,59	6,04	0,000225
AW070196.1	GE557130	2,5545	8,1677	2,5545	5,3102	6,7130	6,6499	9,9924	5,99	2,58	5,99	0,001325
NM_018286.1	GE55928	2,8142	5,0656	2,8142	4,9576	8,8641	9,2354	5,6845	5,63	2,49	5,63	0,001351
T09344.1	GE85798	3,8485	7,4348	3,8485	5,4868	4,3238	8,9043	5,4674	5,62	2,49	5,62	0,000760
NM_020311.1	GE59352	8,6405	5,1175	8,6405	5,7833	2,1539	3,4042	5,3576	5,59	2,48	5,59	0,001371
CA453566.1	GE897002	9,1468	2,9193	9,1468	4,3192	3,9524	2,7964	6,7270	5,57	2,48	5,57	0,002277
AI970209.1	GE733079	6,0411	5,1947	6,0411	9,2062	3,6244	4,6219	4,0486	5,54	2,47	5,54	0,000977
CA411583.1	GE576130	6,3942	2,6636	6,3942	2,1886	8,9548	7,9439	4,1301	5,52	2,47	5,52	0,001621
BX094822.1	GE497740	7,2263	7,9698	7,2263	5,3019	3,8164	4,3972	2,3100	5,46	2,45	5,46	0,000522
BG621614.1	GE880646	4,9054	7,7147	4,9054	10,7365	3,4620	2,3815	3,7259	5,40	2,43	5,40	0,003816
NM_052858.2	GE83669	7,3652	4,6344	7,3652	8,7693	3,1968	2,4173	4,0043	5,39	2,43	5,39	0,001404
AI221469.1	GE794097	6,9318	7,8664	6,9318	4,2836	4,9492	2,4665	2,7602	5,17	2,37	5,17	0,001199
BQ950913.1	GE539718	2,1671	6,9770	2,1671	3,3500	7,4694	7,7547	6,2227	5,16	2,37	5,16	0,002075
NM_080731.1	GE55598	3,9864	7,7553	3,9864	6,6326	4,8373	5,0012	3,2294	5,06	2,34	5,06	0,000167

Anexo 2

Lista genes identificados T/N>5

Nº de acesso	gene	Localização celular	função gene	Presença em tumores	Anticorpo disponível
NM_174981.2	POTED	membrana plasmática	sinalização	próstata, mama, cólon, pulmão, ovário	Sim
NM_006059.2	LAMC3	membrana plasmática	estrutural	nd	nd
NM_002167.2	ID3	nuclear	apoptose, diferenciação celular	carcinoma hepatocelular	sim
NM_080861.3	SPSB3	nd	sinalização	nd	nd
NM_152669.1	FLJ23865	nd	nd	nd	nd
NM_000237.1	LPL	membrana plasmática	metabolismo lipídico	adenocarcinoma pulmão	sim
NM_005795.2	CALCRL	membrana plasmática	relacionado ao gene calcitonina	nd	sim
NM_006636.2	MTHFD2	mitocôndria	metabolismo	nd	nd
NM_182626.1	C2orf48	nd	nd	nd	nd
NM_012260.1	HACL1	peroxisome	hidrolise	nd	nd
NM_005461.3	MAFB	citoplasma, núcleo	transcrição, hematopoese	mieloma múltiplo, desordens linfoproliferativa	sim
NM_003107.2	SOX4	citoplasma, núcleo	transcrição	meduloblastoma; ependimoma; pulmão; carcinoma cólon, bexiga	sim
NM_018286.1	TMEM100	membrana plasmática	estrutural		sim
NM_020311.1	CXCR7	membrana plasmática	transdutor	próstata, pulmão, mama	sim
NM_052858.2	MARVELD3	membrana	estrutural	estomago	nd
NM_080731.1	IFFO1	filamento intermediário	estrutural	nd	nd

nd: não determinado

Anexo 3

Termo de Consentimento Pós-Informação

Você está sendo admitido(a) neste hospital para o tratamento de doença do sistema nervoso central. Como parte de seu tratamento, você será submetido a um exame de sangue e cirurgia na qual se retirará um fragmento de seu cérebro onde está o tumor. Este sangue e o material obtido do cérebro são utilizados em exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. Nestes exames sempre há sobra de material que se torna sem utilidade. Para obter um maior conhecimento clínico e científico das doenças do sistema nervoso central, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca de novos genes ou de lesões genéticas em genes já existentes. Este material restante, que não seria utilizado para diagnóstico, será congelado e posteriormente utilizado para pesquisa científica. O uso deste material não implicará riscos adicionais para você, nem exigirá que se submeta a qualquer procedimento adicional. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, de acordo com o processo nº 830/01, e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do hospital. Todo o material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita a manter o anonimato do paciente. Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concorda em permitir o uso deste material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento. Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário. Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética.

Assinatura do (a) paciente ou Representante Legal

Nome do (a) paciente _____

RG do Prontuário Médico _____

Médico Responsável _____

Anexo 4

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 15/04/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0243/09**, intitulado: **"EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ALVOS EM ASTROCITOMA DE BAIXO GRAU EM RELAÇÃO AO TECIDO CEREBRAL NÃO NEOPLÁSICO"** apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**.

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

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

Pesquisador (a) Executante: **André de Macedo Bianco**

CAPPesq, 15 de Abril de 2009

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

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo 5

Expressão gênica de 22 amostras de tecido cerebral NN, 25 astrocitomas AGII, 18 AGIII e 86 GBM. IDH1 mutação: 0 = ausente, R132H = mutação, branco = não avaliado. Sobrevida geral (OS), status: 0 = vivo e 1 = óbito.

Amostra	Número	CXCR7	CXCR4	HIF1a	IDH1	IDH1 mutação	OS	status
NN	108	0,55	0,39	0,37	0,52			
NN	132	2,06	6,43	1,15	1,95			
NN	167	0,29	0,54	0,58	0,50			
NN	173	0,96	0,46	0,44	0,43			
NN	179	0,65	1,06	1,01	0,95			
NN	189	2,36	0,86	0,72	2,49			
NN	196	0,51	0,51	0,92	1,12			
NN	226	0,75	0,27	0,84	0,41			
NN	232	0,81	0,70	0,64	0,71			
NN	237	0,49	0,85	0,72	0,37			
NN	245	0,47	0,27	0,48	0,99			
NN	263	0,45	3,86	1,03	1,05			
NN	312	2,05	0,77	2,21	2,70			
NN	330	0,95	1,29	1,53	1,30			
NN	332	0,75	0,51	0,91	1,47			
NN	349	1,28	0,87	1,35	1,76			
NN	714	1,25	1,68	1,49	0,97			
NN	755	5,91	3,07	1,55	2,18			
NN	805	1,79	1,90	1,43	1,27			
NN	861	1,18	0,83	2,24	1,39			
NN	929	1,28	3,76	1,42	0,93			
NN	969	1,67	1,53	1,60	0,50			
AG II	55	19,96	9,02	0,80	2,59	0	100	0
AG II	76	6,60	2,30	2,86	3,85	R132H	56	1
AG II	101	4,97	2,06	9,38	5,56	R132H	82	0
AG II	118	4,13	8,26	3,78	13,16	R132H	24	1
AG II	239	8,71	2,85	3,42	4,89		91	0
AG II	250	2,87	1,32	1,55	2,13	R132H	7	0
AG II	254	4,40	2,48	3,78	2,31	R132H	27	0
AG II	267	6,50	3,82	3,61	3,24		96	0
AG II	328	0,23	0,27	0,83	2,28		91	0
AG II	341	10,88	6,34	2,27	5,92		56	1
AG II	346	3,58	6,72	3,26	5,34	0	51	1
AG II	392	3,66	0,56	1,88	1,66	0	95	0
AG II	412	3,20	25,90	5,69	3,30	R132H	84	0
AG II	452	10,44	5,17	5,58	4,16	R132H	96	0
AG II	453	3,09	7,30	4,71	2,33	R132H	44	0
AG II	467	1,29	1,05	2,77	1,13	R132H	41	1
AG II	490	5,46	1,40	2,64	2,80	R132H	38	1
AG II	577	3,29	2,94	4,98	2,50	R132H	50	0

Continua...

Continuação do Anexo 5

Amostra	Número	CXCR7	CXCR4	HIF1a	IDH1	IDH1 mutação	OS	status
AG II	806	4,71	2,20	2,60	2,17		44	0
AG II	999	1,96	1,07	2,99	1,45	R132H	54	0
AG II	1016	1,41	3,43	1,90	2,25		23	0
AG II	1095	6,60	34,71	10,65	2,24	R132H	49	0
AG II	1099	6,96	12,11	3,63	3,71	R132H	48	0
AG II	1113	3,80	7,93	4,52	3,76	R132H	53	0
AG II	1155	4,64	5,39	1,26	1,84	R132H	43	1
AG III	28	15,52	31,69	8,24	5,18	0	99	0
AG III	34	5,16	2,33	15,37	7,81		108	0
AG III	73	12,63	22,52	15,28	3,11		72	1
AG III	233	16,10	9,77	10,08	3,36		13	1
AG III	249	2,28	3,57	2,34	2,73	R132H	7	1
AG III	338	7,82	14,39	14,35	4,07	R132H	14	1
AG III	347	2,81	42,41	3,96	7,40	0	87	0
AG III	360	3,18	8,83	6,52	4,36	0	90	0
AG III	366	1,11	1,10	7,10	17,04	0	80	0
AG III	410	13,48	14,90	7,05	6,41		77	0
AG III	428	2,05	2,48	5,22	3,97		74	0
AG III	478	4,77	2,85	6,21	2,32	R132H	21	1
AG III	514	1,19	7,56	2,61	1,71	R132H	24	0
AG III	734	1,45	29,72	3,69	4,14	0	1	0
AG III	905	6,39	7,92	12,79	9,93	R132H	1	0
AG III	981	4,76	17,87	4,28	4,38		28	1
AG III	1033	2,69	17,84	9,70	5,22	R132H	2	0
AG III	1036	5,27	3,55	5,26	5,74	0	3	1
GBM	35	6,48	28,36	3,87	2,88		45	1
GBM	74	5,75	20,02	3,48	2,59	0	17	1
GBM	175	4,68	91,89	10,92	10,96	0	5	1
GBM	194	7,60	27,39	4,72	8,33	0	22	1
GBM	204	12,97	9,01	3,40	3,17	0	7	1
GBM	208	12,29	54,71	4,98	11,01	0	6	1
GBM	256	4,25	26,39	6,05	17,08	0	2	1
GBM	269	9,50	10,25	6,71	5,50	0	0	1
GBM	274	6,34	32,44	6,99	3,58	0	17	1
GBM	297	4,19	3,94	1,86	1,50	0	11	1
GBM	317	2,66	6,98	3,32	2,57	0	2	1
GBM	356	15,77	12,50	6,09	12,96	0	11	1
GBM	370	2,99	25,81	2,96	2,70	0	13	1
GBM	384	6,62	6,29	2,93	7,97		4	1
GBM	391	5,57	21,23	6,94	5,06	0	12	1
GBM	397	0,80	4,45	2,19	1,89	R132H	5	1
GBM	405	5,36	3,84	3,46	1,61	0	11	1
GBM	427	16,52	13,51	8,85	15,32	0	5	1
GBM	442	4,16	13,47	6,48	10,66	0	4	1
GBM	450	10,21	48,90	5,54	6,98	0	14	1

Continua...

Continuação do Anexo 5

Amostra	Número	CXCR7	CXCR4	HIF1a	IDH1	IDH1 mutação	OS	status
GBM	458	5,02	3,90	5,66	7,78	0	3	1
GBM	485	8,74	19,25	2,19	3,87	0	6	1
GBM	496	33,24	99,72	28,96	32,94	0	8	1
GBM	498	5,38	2,47	2,27	10,31	0	4	1
GBM	503	9,55	7,14	6,17	4,48		2	1
GBM	510	2,48	41,86	6,77	2,51	0	23	1
GBM	522	6,58	18,66	3,74	3,04		24	1
GBM	524	13,54	36,85	10,60	7,95		8	1
GBM	547	4,06	106,35	5,27	3,37		13	1
GBM	555	8,44	32,71	3,01	6,40	0	18	1
GBM	573	8,11	403,05	22,13	10,32		9	1
GBM	592	12,15	2,69	3,79	19,35		45	0
GBM	629	2,96	16,58	5,45	8,28	0	14	1
GBM	632	0,91	2,69	3,28	4,91	R132H	28	1
GBM	638	6,48	20,53	6,86	9,23	0	2	1
GBM	640	19,38	17,58	4,73	8,77		5	1
GBM	642	8,37	21,41	7,91	9,40	0	17	1
GBM	663	12,42	182,89	6,57	9,79	0	7	1
GBM	684	16,68	3,78	2,15	8,27	0	1	1
GBM	687	11,98	2,97	4,04	5,76	0	9	1
GBM	698	5,90	1,56	2,37	5,89	0	7	1
GBM	724	7,41	31,12	21,05	14,79	0	0	1
GBM	743	8,35	44,51	10,78	11,18		2	1
GBM	750	8,12	7,26	9,30	7,45	0	6	1
GBM	792	3,27	2,61	1,91	8,44	0	5	1
GBM	795	3,90	9,29	7,11	6,74	0	11	1
GBM	852	4,89	10,13	7,43	5,36	0	13	1
GBM	854	20,41	18,84	19,29	16,03	0	65	0
GBM	875	10,15	8,80	4,83	5,39	0	15	1
GBM	879	2,30	2,34	2,24	2,77	0	3	1
GBM	881	4,32	4,29	7,98	9,08	0	4	1
GBM	884	10,47	24,21	7,79	5,58	0	27	1
GBM	885	26,67	12,10	4,95	9,15		2	1
GBM	891	8,13	7,35	4,86	17,88	0	7	1
GBM	901	28,55	64,46	30,84	19,73	R132H	2	1
GBM	903	15,92	94,83	33,19	26,34	0	22	1
GBM	925	74,86	59,34	20,54	25,60	0	12	1
GBM	930	22,18	18,27	13,01	28,31	R132H	31	1
GBM	1002	4,27	60,06	16,07	3,42	0	2	1
GBM	1003	3,76	3,63	1,90	7,37	0	4	1
GBM	1007	1,21	2,11	5,33	2,77	R132H	3	1
GBM	1009	0,61	2,03	0,53	0,17	0	7	1
GBM	1070	1,48	6,57	6,85	3,18	0	8	1
GBM	1074	4,81	13,23	7,24	2,65	0	58	0
GBM	1077	5,25	10,79	4,71	3,98		32	1

Continua...

Conclusão do Anexo 5

Amostra	Número	CXCR7	CXCR4	HIF1a	IDH1	IDH1 mutação	OS	status
GBM	1084	6,36	83,52	11,75	10,20	0	5	1
GBM	1091	9,05	11,37	3,85	5,60	0	23	1
GBM	1103	1,96	9,12	9,41	7,95	0	14	1
GBM	1118	18,81	48,60	7,67	4,30	0	2	1
GBM	1122	0,70	26,49	5,00	5,15	0	5	1
GBM	1123	5,05	9,92	8,08	8,36	0	11	1
GBM	1124	5,59	5,15	2,47	1,00	0	4	1
GBM	1133	12,09	5,01	7,04	7,00	0	9	1
GBM	1144	11,05	4,93	4,47	2,88	0	2	1
GBM	1161	21,72	17,46	8,77	4,04	0	13	1
GBM	1162	9,16	8,97	4,19	10,50	0	15	1
GBM	1169	6,89	16,05	5,24	5,10	0	2	1
GBM	1190	4,63	16,85	8,99	5,45	0	9	1
GBM	1194	1,81	4,05	3,93	1,50	R132H	10	1
GBM	1199	7,95	4,84	9,57	1,32	R132H	11	1
GBM	1205	3,96	3,19	9,78	3,44	0	38	0
GBM	1212	5,53	4,48	5,32	2,77	R132H	13	1
GBM	1232	2,01	21,33	4,90	5,07	0	12	1
GBM	1237	7,87	11,77	5,71	3,83	0	7	1
GBM	1243	11,32	17,58	4,32	15,11	0	10	1
GBM	1250	12,15	17,06	4,74	4,58	0	7	1

9 REFERÊNCIAS

1. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):50–6.
2. Zlotnik A. Chemokines and cancer. *Int. J. Cancer*. 2006 Nov 1;119(9):2026–9.
3. Kruizinga RC, Bestebroer J, Berghuis P, de Haas CJC, Links TP, de Vries EGE, et al. Role of chemokines and their receptors in cancer. *Curr Pharm Des*. 2009;15(29):3396–416.
4. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul;4(7):540–50.
5. Savarin-Vuaillet C, Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? *Neurotherapeutics*. 2007 Oct;4(4):590–601.
6. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Schettini G. Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem*. 2002 Sep;82(6):1311–29.
7. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest*. 2006 Dec;86(12):1221–32.
8. Calatuzzolo C, Maderna E, Pollo B, Gelati M, Marras C, Silvani A, et al. Prognostic value of CXCL12 expression in 40 low-grade oligodendrogliomas and oligoastrocytomas. *Cancer Biol Ther*. 2006 Jul;5(7):827–32.
9. Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem*. 2002 Dec 20;277(51):49481–7.

10. Hong X, Jiang F, Kalkanis SN, Zhang ZG, Zhang X-P, DeCarvalho AC, et al. SDF-1 and CXCR4 are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion. *Cancer Lett.* 2006 May 8;236(1):39–45.
11. Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Mürköster SS, Penfold MET, Schall TJ, et al. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res.* 2010 Apr 15;70(8):3299–308.
12. Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutiérrez JA. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2000 Jan;6(1):102–11.
13. Oh JW, Drabik K, Kutsch O, Choi C, Tousson A, Benveniste EN. CXC chemokine receptor 4 expression and function in human astrogloma cells. *J Immunol.* 2001 Feb 15;166(4):2695–704.
14. Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, Porcile C, Pirani P, Ravetti JL, et al. Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res.* 2003 Apr 15;63(8):1969–74.
15. Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, et al. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.* 2003 Nov 11;100(23):13513–8.
16. Salmaggi A, Gelati M, Pollo B, Frigerio S, Eoli M, Silvani A, et al. CXCL12 in malignant glial tumors: a possible role in angiogenesis and cross-talk between endothelial and tumoral cells. *J Neurooncol.* 2004 May;67(3):305–17.
17. Salmaggi A, Gelati M, Pollo B, Marras C, Silvani A, Balestrini MR, et al. CXCL12 expression is predictive of a shorter time to tumor progression in low-grade glioma: a single-institution study in 50 patients. *J Neurooncol.* 2005 Sep;74(3):287–93.

18. Bian X, Yang S, Chen J, Ping Y, Zhou X, Wang Q, et al. Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival. *Neurosurgery*. 2007 Sep;61(3):570–578; discussion 578–579.
19. Liu Y-L, Yu J-M, Song X-R, Wang X-W, Xing L-G, Gao B-B. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia-inducible factor in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biol Ther*. 2006 Oct;5(10):1320–6.
20. Oh YS, Kim HY, Song I-C, Yun H-J, Jo D-Y, Kim S, et al. Hypoxia induces CXCR4 expression and biological activity in gastric cancer cells through activation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Onco. Rep*. 2012 Dec;28(6):2239–46.
21. Schutyser E, Su Y, Yu Y, Gouwy M, Zaja-Milatovic S, Van Damme J, et al. Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. *Eur Cytokine Netw*. 2007 Jun;18(2):59–70.
22. Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol Cancer*. 2010;9:17.
23. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*. 2006 Sep 4;203(9):2201–13.
24. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KYC, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2005 Oct 21;280(42):35760–6.
25. Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med*. 2008 Feb 18;205(2):479–90.
26. Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2008 Feb 15;283(7):4283–94.

27. Gebauer F, Tachezy M, Effenberger K, von Loga K, Zander H, Marx A, et al. Prognostic impact of CXCR4 and CXCR7 expression in pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Oncol*. 2011 Aug 1;104(2):140–5.
28. D’Alterio C, Consales C, Polimeno M, Franco R, Cindolo L, Portella L, et al. Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010 Nov;10(7):772–81.
29. Hao M, Zheng J, Hou K, Wang J, Chen X, Lu X, et al. Role of chemokine receptor CXCR7 in bladder cancer progression. *Biochem Pharmacol*. 2012 Jul 15;84(2):204–14.
30. Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 2007 Oct 2;104(40):15735–40.
31. Calatuzzolo C, Canazza A, Pollo B, Di Pierro E, Ciusani E, Maderna E, et al. Expression of the new CXCL12 receptor, CXCR7, in gliomas. *Cancer Biol Ther*. 2011 Jan 15;11(2):242–53.
32. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-oncology*. 2012 Nov;14 Suppl 5:v1–v49.
33. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Mar;61(3):215–225; discussion 226–229.
34. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987–96.
35. Chang EF, Clark A, Jensen RL, Bernstein M, Guha A, Carrabba G, et al. Multiinstitutional validation of the University of California at San Francisco Low-Grade Glioma Prognostic Scoring System. Clinical article. *J Neurosurg*. 2009 Aug;111(2):203–10.

36. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008 Jul 31;359(5):492–507.
37. Johannesen TB, Langmark F, Lote K. Progress in long-term survival in adult patients with supratentorial low-grade gliomas: a population-based study of 993 patients in whom tumors were diagnosed between 1970 and 1993. *J Neurosurg*. 2003 Nov;99(5):854–62.
38. Ichimura K, Pearson DM, Kocalkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DTW, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-oncology*. 2009 Aug;11(4):341–7.
39. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2009 Oct;118(4):469–74.
40. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000 Feb;12(2):121–7.
41. Murphy PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*. 2002 Jun;54(2):227–9.
42. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):27348–57.
43. Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T, Moser B, Baggiolini M. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993 Apr 15;90(8):3574–7.
44. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000 Jul;68(1):1–8.
45. Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity*. 2009 Nov 20;31(5):711–21.

46. Mantovani A, Allavena P, Sozzani S, Vecchi A, Locati M, Sica A. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol.* 2004 Jun;14(3):155–60.
47. Opdenakker G, Van Damme J. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):519–27.
48. Lazarini F, Tham TN, Casanova P, Arenzana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia.* 2003 Apr 15;42(2):139–48.
49. Karin N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1alpha) in the regulation of immunity during health and disease. *J Leukoc Biol.* 2010 Sep;88(3):463–73.
50. Tiveron M-C, Rossel M, Moepps B, Zhang YL, Seidenfaden R, Favor J, et al. Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci.* 2006 Dec 20;26(51):13273–8.
51. Stumm RK, Zhou C, Ara T, Lazarini F, Dubois-Dalcq M, Nagasawa T, et al. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci.* 2003 Jun 15;23(12):5123–30.
52. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med.* 2010 Mar;16(3):133–44.
53. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv Cancer Res.* 2010;106:91–111.
54. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell.* 2004 Jul;6(1):17–32.

55. Hartmann TN, Burger M, Burger JA. The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004 Jun;18(2):126–30.
56. Kang H, Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer. *Breast*. 2005 Oct;14(5):360–7.
57. Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jun 15;167(12):1676–86.
58. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res*. 2002 Oct 15;62(20):5930–8.
59. Pan J, Mestas J, Burdick MD, Phillips RJ, Thomas GV, Reckamp K, et al. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer*. 2006;5:56.
60. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res*. 2002 Mar 15;62(6):1832–7.
61. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med*. 2003 Nov 3;198(9):1391–402.
62. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*. 2003 Sep 18;425(6955):307–11.
63. Li M, Ransohoff RM. The roles of chemokine CXCL12 in embryonic and brain tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009 Apr;19(2):111–5.

-
64. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. “Pseudopalisading” necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Jun;65(6):529–39.
 65. Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest*. 2010 Mar;120(3):694–705.
 66. O’Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem. J*. 2008 Feb 1;409(3):635–49.
 67. Liang Y, Bollen AW, Gupta N. CC chemokine receptor-2A is frequently overexpressed in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2008 Jan;86(2):153–63.
 68. Galasso JM, Stegman LD, Blaivas M, Harrison JK, Ross BD, Silverstein FS. Experimental gliosarcoma induces chemokine receptor expression in rat brain. *Exp Neurol*. 2000 Jan;161(1):85–95.
 69. Kouno J, Nagai H, Nagahata T, Onda M, Yamaguchi H, Adachi K, et al. Up-regulation of CC chemokine, CCL3L1, and receptors, CCR3, CCR5 in human glioblastoma that promotes cell growth. *J Neurooncol*. 2004 Dec;70(3):301–7.
 70. Kalev I, Kaasik A, Zarkovski A, Mikelsaar A-V. Chemokine receptor CCR5 expression in in vitro differentiating human fetal neural stem/progenitor and glioblastoma cells. *Neurosci Lett*. 2006 Feb 6;394(1):22–7.
 71. Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Jan;57(1):123–31.
 72. Bajetto A, Barbieri F, Dorcaratto A, Barbero S, Daga A, Porcile C, et al. Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem Int*. 2006 Oct;49(5):423–32.

73. Kulbe H, Levinson NR, Balkwill F, Wilson JL. The chemokine network in cancer-much more than directing cell movement. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):489–96.
74. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1149–53.
75. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Jul 7;102(13):932–41.
76. Haselbeck RJ, McAlister-Henn L. Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *J Biol Chem.* 1993 Jun 5;268(16):12116–22.
77. Joseph JW, Jensen MV, Ilkayeva O, Palmieri F, Alárcon C, Rhodes CJ, et al. The mitochondrial citrate/isocitrate carrier plays a regulatory role in glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem.* 2006 Nov 24;281(47):35624–32.
78. Minard KI, McAlister-Henn L. Dependence of peroxisomal beta-oxidation on cytosolic sources of NADPH. *J Biol Chem.* 1999 Feb 5;274(6):3402–6.
79. Lee S-M, Park SY, Shin SW, Kil IS, Yang ES, Park J-W. Silencing of cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase by small interfering RNA enhances the sensitivity of HeLa cells toward staurosporine. *Free Radic Res.* 2009 Feb;43(2):165–73.
80. Lee SH, Jo SH, Lee SM, Koh HJ, Song H, Park JW, et al. Role of NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP+-ICDH) on cellular defence against oxidative injury by gamma-rays. *Int J Radiat Biol.* 2004 Sep;80(9):635–42.
81. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008 Sep 26;321(5897):1807–12.

82. Narahara K, Kimura S, Kikkawa K, Takahashi Y, Wakita Y, Kasai R, et al. Probable assignment of soluble isocitrate dehydrogenase (IDH1) to 2q33.3. *Hum Genet.* 1985;71(1):37–40.
83. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):765–73.
84. Van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJB, Wesseling P, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res.* 2010 Mar 1;16(5):1597–604.
85. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science.* 2009 Apr 10;324(5924):261–5.
86. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009 Dec 10;462(7274):739–44.
87. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim S-H, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell.* 2011 Jan 18;19(1):17–30.
88. Frezza C, Tennant DA, Gottlieb E. IDH1 mutations in gliomas: when an enzyme loses its grip. *Cancer Cell.* 2010 Jan 19;17(1):7–9.
89. Uno M, Oba-Shinjo SM, Silva R da, Miura F, Clara CA, Almeida JRW de, et al. IDH1 mutations in a Brazilian series of Glioblastoma. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(1):163–5.
90. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 1;27(25):4150–4.

91. Dubbink HJ, Taal W, van Marion R, Kros JM, van Heuvel I, Bromberg JE, et al. IDH1 mutations in low-grade astrocytomas predict survival but not response to temozolomide. *Neurology*. 2009 Nov 24;73(21):1792–5.
92. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 1;27(34):5743–50.
93. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):5874–80.
94. Wise DR, Ward PS, Shay JES, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, et al. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 2011 Dec 6;108(49):19611–6.
95. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1995 Jun 6;92(12):5510–4.
96. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006 Nov;70(5):1469–80.
97. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*. 1996 Dec 13;271(50):32253–9.
98. Schmid T, Zhou J, Brüne B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2004 Dec;8(4):423–31.
99. Khromova NV, Kopnin PB, Stepanova EV, Agapova LS, Kopnin BP. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. *Cancer Lett*. 2009 Apr 18;276(2):143–51.

100. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 2000 Feb 15;14(4):391–6.
101. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2010 Feb;20(1):51–6.
102. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):677–84.
103. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992 Oct 29;359(6398):843–5.
104. Damert A, Machein M, Breier G, Fujita MQ, Hanahan D, Risau W, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in a rat glioma is conferred by two distinct hypoxia-driven mechanisms. *Cancer Res.* 1997 Sep 1;57(17):3860–4.
105. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 2006 Mar 1;107(5):1761–7.
106. Su L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, et al. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2005 Dec 1;11(23):8273–80.
107. Saur D, Seidler B, Schneider G, Algül H, Beck R, Senekowitsch-Schmidtke R, et al. CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2005 Oct;129(4):1237–50.
108. Woerner BM, Warrington NM, Kung AL, Perry A, Rubin JB. Widespread CXCR4 activation in astrocytomas revealed by phospho-CXCR4-specific antibodies. *Cancer Res.* 2005 Dec 15;65(24):11392–9.
109. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006 Jul;59(1):15–26.

110. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999 Nov 15;59(22):5830–5.
111. Auerbach R, Kubai L, Sidky Y. Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues, and lymphocytes. *Cancer Res.* 1976 Sep;36(9 PT 2):3435–40.
112. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem.* 2003 Jan;49(1):32–40.
113. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992 Jun 5;267(16):10931–4.
114. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol. Med.* 1995;6(3):230–47.
115. Tandle A, Blazer DG 3rd, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *J Transl Med.* 2004 Jun 25;2(1):22.
116. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.* 1994 Sep 9;265(5178):1582–4.
117. Kargiotis O, Rao JS, Kyritsis AP. Mechanisms of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol.* 2006 Jul;78(3):281–93.
118. Kerbel RS. Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008 May 8;358(19):2039–49.
119. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science.* 2000 Aug 18;289(5482):1197–202.
120. Charalambous C, Hofman FM, Chen TC. Functional and phenotypic differences between glioblastoma multiforme-derived and normal human brain endothelial cells. *J Neurosurg.* 2005 Apr;102(4):699–705.
121. Miebach S, Grau S, Hummel V, Rieckmann P, Tonn J-C, Goldbrunner RH. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from gliomas of different WHO grades. *J Neurooncol.* 2006 Jan;76(1):39–48.

122. Takano S, Yamashita T, Ohneda O. Molecular therapeutic targets for glioma angiogenesis. *J Oncol*. 2010;2010:351908.
123. Birlik B, Canda S, Ozer E. Tumour vascularity is of prognostic significance in adult, but not paediatric astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006 Oct;32(5):532–8.
124. Leon SP, Folkerth RD, Black PM. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer*. 1996 Jan 15;77(2):362–72.
125. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg*. 1972 Mar;175(3):409–16.
126. Marie SKN, Okamoto OK, Uno M, Hasegawa APG, Oba-Shinjo SM, Cohen T, et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int J Cancer*. 2008 Feb 15;122(4):807–15.
127. Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*. 2002 Apr;12(4):656–64.
128. Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol. Biol*. 2009;10:17.
129. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
130. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
131. Ehtesham M, Mapara KY, Stevenson CB, Thompson RC. CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Lett*. 2009 Feb 18;274(2):305–12.

132. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007 Sep 13;1(3):313–23.
133. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes H-G, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9175.
134. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelerie F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6085–93.
135. Décaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *J Biol Chem*. 2011 Sep 16;286(37):32188–97.
136. Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, et al. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2010 Jan 12;107(2):628–32.
137. Odemis V, Lipfert J, Kraft R, Hajek P, Abraham G, Hattermann K, et al. The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia*. 2012 Mar;60(3):372–81.
138. Miekus K, Jarocha D, Trzyna E, Majka M. Role of I-TAC-binding receptors CXCR3 and CXCR7 in proliferation, activation of intracellular signaling pathways and migration of various tumor cell lines. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2010 Jan 1;48(1):104–11.
139. Salmaggi A, Maderna E, Calatuzzolo C, Gaviani P, Canazza A, Milanesi I, et al. CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression in brain metastases. *Cancer Biol. Ther.* 2009 Sep;8(17):1608–14.
140. Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, Sonobe M, Nagai S, Okubo K, et al. Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2009 Jun 1;115(11):2580–93.

141. Zheng K, Li H-Y, Su X-L, Wang X-Y, Tian T, Li F, et al. Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:31.
142. Liang JJ, Zhu S, Bruggeman R, Zaino RJ, Evans DB, Fleming JB, et al. High levels of expression of human stromal cell-derived factor-1 are associated with worse prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Oct;19(10):2598–604.
143. Wang L, Chen W, Gao L, Yang Q, Liu B, Wu Z, et al. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2012 Oct 7;10(1):212.
144. Maishi N, Ohga N, Hida Y, Akiyama K, Kitayama K, Osawa T, et al. CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. *Pathol Int*. 2012 May;62(5):309–17.
145. Schrevel M, Karim R, ter Haar NT, van der Burg SH, Trimbos JBMZ, Fleuren GJ, et al. CXCR7 expression is associated with disease-free and disease-specific survival in cervical cancer patients. *Br J Cancer*. 2012 Apr 24;106(9):1520–5.
146. Wang Y-N, Hung M-C. Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci*. 2012;2(1):13.
147. Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med*. 2011 Nov;12(66):419–32.
148. Wang S-C, Hung M-C. Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 1;15(21):6484–9.
149. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, et al. HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*. 2008 Mar;13(3):206–20.

150. Liu H, Xue W, Ge G, Luo X, Li Y, Xiang H, et al. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 α in MSCs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Oct 29;401(4):509–15.
151. Leu S, von Felten S, Frank S, Vassella E, Vajtai I, Taylor E, et al. IDH/MGMT-driven molecular classification of low-grade glioma is a strong predictor for long-term survival. *Neuro-oncology*. 2013 Apr;15(4):469–79.
152. Williams SC, Karajannis MA, Chiriboga L, Golfinos JG, von Deimling A, Zagzag D. R132H-mutation of isocitrate dehydrogenase-1 is not sufficient for HIF-1 α upregulation in adult glioma. *Acta Neuropathol*. 2011 Feb;121(2):279–81.
153. Loenarz C, Schofield CJ. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat Chem Biol*. 2008 Mar;4(3):152–6.
154. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997–1003.

10 APÊNDICES

10.1 Artigo submetido à publicação

Neuro-Oncology <neurooncology@mdanderson.org>

10 de junho de 2013 20:14

Para: Andre Macedo Bianco <abianco@usp.br>

Submission Confirmation for CXCR7 and CXCR4 expressions in infiltrative astrocytomas and their interaction with HIF1<alpha> expression and IDH1 mutation.

Dear Dr. Bianco,

Your submission entitled "CXCR7 and CXCR4 expressions in infiltrative astrocytomas and their interaction with HIF1<alpha> expression and IDH1 mutation." has been received by Neuro-Oncology

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

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Donna B. Sims
Peer Review Coordinator
Editorial Office
Neuro-Oncology

Cover Letter

Covering Letter

To,
NEURO-ONCOLOGY

Sub: Submission of Manuscript for publication

Dear Sir,

We intend to publish an article entitled “***CXCR7 and CXCR4 expressions in infiltrative astrocytomas and their interaction with HIF1 α expression and IDH1 mutation***”

On behalf of all the contributors I will act and guarantor and will correspond with the journal from this point onward.

We hereby transfer, assign, or otherwise convey all copyright ownership, including any and all rights incidental thereto, exclusively to the journal, in the event that such work is published by the journal.

Thanking you,

Yours' sincerely,

Corresponding contributor:

Andre Macedo Bianco

Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil
Laboratory of Molecular and Cellular Biology – LIM15
Av. Dr. Arnaldo, 455, 4th floor, r.4110
Sao Paulo, SP, Brazil
zip code: 01246-903
Phone/fax: +55-11-3061-7458
abianco@usp.br;
amb0973@gmail.com

*Manuscript

[Click here to download Manuscript: CXCR7](#)

1

CXCR7 and CXCR4 expressions in infiltrative astrocytomas and their interactions with HIF1 α expression and IDH1 mutation.

shortened title: ***CXCR7 in astrocytomas with HIF1 α and IDH1mut***

Authors

Andre Macedo Bianco

Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Laboratory of Molecular and Cellular Biology – LIM15

Av. Dr. Arnaldo, 455, 4th floor, r.4110 Sao Paulo, SP, Brazil zip code: 01246-903

Phone: +55-11-3061-7458

abianco@usp.br

Miyuki Uno

Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Laboratory of Molecular and Cellular Biology – LIM15

Av. Dr. Arnaldo, 455, 4th floor, r.4110 Sao Paulo, SP, Brazil zip code: 01246-903

Phone: +55-11-3061-7458

unomiyuki99@hotmail.com

Sueli Miekko Oba-Shinjo

Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Laboratory of Molecular and Cellular Biology – LIM15

Av. Dr. Arnaldo, 455, 4th floor, r.4110 Sao Paulo, SP, Brazil zip code: 01246-903

Phone: +55-11-3061-7458

suelimoba@usp.br

Carlos Afonso Clara

Cancer Hospital of Barretos, Pio XII Foundation, State of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Rua Antenos Duarte Villela, 1331 Barretos, SP, Brazil zip code: 14784-400

Phone: +55-17-3321-66-00

carlosclara@terra.com.br

Thais Fernanda de Almeida Galatro

Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Laboratory of Molecular and Cellular Biology – LIM15

Av. Dr. Arnaldo, 455, 4th floor, r.4110 Sao Paulo, SP, Brazil zip code: 01246-903

Phone: +55-11-3061-7458

thaisgalatro@hotmail.com

Sergio Rosemberg

Department of Pathology, School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Av. Dr. Arnaldo, 455, Sao Paulo, SP, Brazil zip code: 01246-903

srosem@uol.com.br

Manoel Jacobsen Teixeira

Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Av. Dr. Arnaldo, 455, 4th floor, r.4110 Sao Paulo, SP, Brazil zip code: 01246-903

Phone: +55-11-3061-7458

manoelj@netway.com.br

Suely Kazue Nagahashi Marie

Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Laboratory of Molecular and Cellular Biology – LIM15

Av. Dr. Arnaldo, 455, 4th floor, r.4110 Sao Paulo, SP, Brazil zip code: 01246-903

Phone: +55-11-3061-7458

sknmarie@usp.br

Conflict of interest: There is no conflict of interest to declare.

Funding: This work was supported by FAPESP projects: # 01/12898-4 and 04/12133-6.

The authors state that neither the submitted paper nor any similar paper, in whole or in part, other than an abstract or preliminary communication, has been or will be submitted to or published in any other source.

ABSTRACT

Background: The CXCR7, a new receptor for CXCL12 with higher affinity than CXCR4 has raised key issues on glioma cell migration. The aim of this study is to investigate the CXCR7 mRNA expression in diffuse astrocytomas tissues and to evaluate its interactions with CXCR4 and HIF1 α expression and IDH1 mutation.

Methods: CXCR7, CXCR4 and HIF1 α mRNA expression were evaluated in 129 frozen samples of astrocytomas. IDH1 mutation status was analyzed with gene expressions, matched with clinicopathological parameters and overall survival time. Protein expression was analyzed by immunohistochemistry in different grades of astrocytoma and in glioma cell line (U87MG) by confocal microscopy.

Results: There was significant difference in the expression levels of the genes studied between astrocytomas and non-neoplastic (NN) controls ($p<0.001$). AGII showed no significant correlation between CXCR7/HIF1 α ($p=0.548$); there was significant correlation between CXCR7/CXCR4 ($p=0.042$) and CXCR7/IDH1 ($p=0.008$). GBM showed significant correlations between CXCR7/CXCR4 ($p=0.002$), CXCR7/IDH1 ($p<0.001$) and CXCR7/HIF1 α ($p=0.008$). HIF1 α overexpression was associated with higher expressions of CXCR7 ($p=0.01$) and CXCR4 ($p<0.0001$), while IDH1 mutation was associated with lower CXCR7 ($p=0.009$) and CXCR4 ($p=0.0005$) mRNA expressions. Protein expression increased with malignancy and in U87MG cell line was mainly localized in the cellular membrane.

Conclusion: CXCR7 was overexpressed in astrocytoma and correlates with CXCR4 and IDH1 in AGII and CXCR4, IDH1 and HIF1 α in GBM. Overexpression HIF1 α was related with higher expressions of CXCR7 and CXCR4, otherwise IDH1 mutation related with lower expression of both genes. No association between CXCR7 and CXCR4 expression and survival data was related.

Keywords: chemokine, astrocytoma, CXCR7, CXCR4, HIF1 α , IDH1

INTRODUCTION

Gliomas represent 70% of primary tumors of the central nervous system (CNS) and 80% of malignant tumors in young adults (20 to 34 years of age).¹ Diffuse astrocytomas are so designated because these tumors invade the brain tissue by diffuse cellular infiltration and have a significant potential to assume a progressively more malignant biologic behavior over a long period of time. The World Health Organization (WHO) classifies these astrocytomas in three grades based on the histologic features: grade II (diffuse astrocytoma), grade III (anaplastic astrocytoma) and grade IV (glioblastoma).² Astrocytomas are the most common and the most aggressive primary brain tumors. The median overall survival of patients with diffuse astrocytomas is between 3 and 20 years³⁻⁸, whereas the median survival of patients with glioblastoma is approximately 1 year.⁹

Previous reports have shown that chemokines and their receptors play important roles for in tumour growth, metastasis and angiogenesis.¹⁰⁻¹² There is abundant evidence showing that chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4, the most frequently overexpressed and best characterized chemokine receptor on tumor cells, are involved in progression of tumors.¹³⁻¹⁶ The recent deorphanization of CXCR7 as an additional receptor for CXCL12 with higher affinity than CXCR4 has raised key issues on glioma cell migration.^{17,18} Previous studies showed that the hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) transcriptional factor induces CXCL12 and CXCR4 expressions and promoted angiogenesis and cancer cell invasion.¹⁹⁻²³

The *IDH1* mutation is present in the vast majority of low-grade gliomas and secondary glioblastomas.²⁴ A recent report showed that mutated *IDH1* does not convert isocitrate into α -ketoglutarate (α -KG) but rather enables IDH1 to convert α -KG into 2-hydroxyglutarate (2HG)²⁵ that influences a range of cellular programs, affecting the epigenome, the transcriptional programs and the hypoxia-inducible factor.

The link between *IDH1* and *HIF1 α* highlights the emerging hypothesis that altered metabolic enzymes contribute to tumor growth by stimulating the HIF1 pathway and tumor angiogenesis.

The expression and prognostic impact of *CXCR7* in gliomas has been investigated in only a few studies, and there are even less data available about the expression of *CXCR7* in astrocytomas.^{13,16,26} The aim of this study is to investigate the expression of *CXCR7* in a large

series of diffuse astrocytoma tissues and to evaluate its associated expression with *CXCR4*, *HIF1 α* and presence of *IDH1* mutation.

METHOD

This study was approved by the ethics committee of Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo (0243/09). All patients gave written informed consent for the use of their resected tumor. All data including patient age, sex, date of first symptoms, Karnofsky (KPS) and histological diagnostic according to the WHO classification system were extracted from a combination of clinical and pathological records and outpatient clinic records. All patients were monitored until death or until December 31, 2011.

Tumor samples

Twenty two non-neoplastic tissues from epilepsy surgeries (from epilepsy temporal lobectomy procedures) and 129 frozen samples of diffusely infiltrative astrocytomas (25 AGII, 18 AGIII and 86 GBM) were collected during surgical procedures performed by the Neurosurgery Group of the Department of Neurology, School of Medicine of Sao Paulo University, Brazil. Fresh surgical samples were snap-frozen in liquid nitrogen immediately after surgical removal. A 4 µm thick cryostat section of each sample was obtained for histological assessment under light microscopy after hematoxylin-eosin staining. Necrotic and non-neoplastic areas were removed from the frozen block of tissue by microdissection prior to DNA and RNA extraction.

Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from each sample using the RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc, Hilden, Germany). Synthesis of cDNA was performed by conventional reverse transcription, using oligo (dT), random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA) for extension, RNase inhibitor and Super Script III according to manufacturer's specifications (Invitrogen). The resulting cDNA was treated with RNase H (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and diluted with TE buffer.

Quantitative Real time PCR (qRT-PCR)

The relative expression of *CXCR7*, *CXCR4*, *IDH1* and *HIF1 α* was determined by a quantitative real time PCR (qRT-PCR) using the Syber Green I approach. Primers were designed to amplify a 93 bp length amplicon with the following set of primers (5' to 3'): *CXCR7* F: GGTCATTTGATTGCCCCGCT, R: GTTGCATGGCCAGCTGATGT; *CXCR4* F: AATCTTCCTGCCCACCATCTACT, R: GTTGCATGGCCAGCTGATGT; *IDH1* F: GGCTTGTGAGTGGATGGGTAA, R: AGGCCAGGAACAACAAAATC; and *HIF1 α* F: CATCCAAGAAGCCCTAACGTGT, R: CATTTTTCGCTTTCTCTGAGCAT. Standard curves were established to ensure amplification efficiency and analysis of melting curves demonstrated a single peak for the primers. SYBR Green I amplification mixtures (12 μ L) contained 3 μ L of cDNA, 6 μ L of 2X Power SYBR Green I Master Mix (Applied Biosystems) and 3 μ L of mixture forward and reverse primers to a final concentration 200 nM. Reactions were run on ABI Prism 7500 sequence detector (Applied Biosystems). PCR was carried out as follows: 2 min at 50°C, 10 min period of polymerase activation at 95°C, and 40 cycles at 95°C for 15 sec, and 60°C for 1 min. Quantitative data were normalized relative to the internal housekeeping controls: hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene (HPRT), beta-glucuronidase gene (GUS β) and TATA-box binding protein (TBP) according to Valente et al.²⁷ The geometric mean of the three genes was used for normalized the relative expression analysis. Primer sequences were as follows (5' to 3'): HPRT F: TGAGGATTTGGAAAGGGTGT, R: GAGCACACAGAGGGCTACAA; GUS β F: AAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT, R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA and TBP F: AGGATAAGAGAGCCACGAACCA, R: CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT. The final primers concentrations were 200 nM for HPRT, TBP and 400 nM for GUS β . The equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was applied to calculate the relative expression of genes in tumor samples versus the mean of non-neoplastic tissues where $\Delta Ct = \text{mean } Ct \text{ gene} - \text{geometric mean } Ct \text{ of housekeeping genes}$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tumor} - \text{mean } \Delta Ct \text{ non-neoplastic tissues}$.²⁸ The qRT-PCR runs for each sample were performed in duplicate and repeated whenever the Ct values were not similar. Gene expression was scored according to the astrocytoma grade. For statistical analysis, scores $\geq$ median values were defined as overexpression.

Previously determined *IDH1* mutational status of 105 samples of astrocytomas, was obtained from the tumor bank maintained by the Department of Neurology, Hospital das Clínicas, School of Medicine of the São Paulo University.²⁹

Immunohistochemistry and immunofluorescence

For immunohistochemical detection of CXCR7, tissue sections were processed and subjected to antigen retrieval. The slides were immersed in 10mM citrate buffer, pH 6.0, and incubated at 122 °C for 4 minutes using electric pressure cooker (BioCare Medical, Walnut Creek, USA). The specimens were blocked and then incubated with the primary antibodies at the final dilution of 1:200, at a temperature from 16 to 20°C for 16 hours. The reaction was revealed using a diaminobenzidine commercial kit (Novolink, Novocastra, NewCastle-upon-Tyne, UK) at room temperature, and Harris hematoxylin for nuclear staining. A semi-quantitative score system considering both intensity of staining and percentage of cells was applied as follows: for intensity of staining, 0 = negative, 1 = weak, 2 = moderate and 3=strong; for cell percentage, 0=no cells stained, 1=10–25%, 2=26–50%, 3=51–75% and 4=76–100%. Only cases with positive cell staining with scores ≥ 2 were considered as positive. Digital photomicrographs of representative fields were captured and processed using Picasa 3 (Google, Mountain View, USA).

The immunofluorescence staining procedure was performed using U87MG cell line fixed with 10% formalin. After successive washing with 0.05% Tween (Merck, Darmstadt, Germany) diluted in PBS, cells were incubated in blocking solution containing 5% goat serum (Sigma), 0.3% TritonX-100 (Sigma) in PBS and 1h at ambient temperature over a shaker. The cells were then incubated with primary antibodies diluted in blocking solution at 48°C for 24 h. After this period, the sections were washed again five times with PBS-Tween and incubated for another 24 hours at 48°C with secondary antibodies diluted in 0.3% TritonX-100 in PBS by introducing 40.6 - diamidine-2-phenylindole dihydrochloride (Sigma) at 1:10.000 to nuclear staining. Primary antibody used was as follows: CXCR7 (Abcam®, dilution 1:600) and secondary antibodies anti-mouse AlexaFluor 594 (Molecular Probes) used at 1:200. The images were obtained with Leica TCS SP2 confocal system (405nm diode ARKR 488 nm, 594 nm, Ar, and 633nm lasers Xn, Munich, Germany) using 20x0.7 or 63x1.2 objectives, with automatic adjustment of the hole to

get a airyunit 1 to ensure maximum confocality. Tissue was scanned at a thickness of 2 mm, and images were scanned at 2048x2048 pixels.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov normality test was used to analyse the distribution of the expression data and observational time. Statistical analysis of the distribution of the relative expression by qRT-PCR of the four genes studied in the series was performed by the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's comparison. Correlation between two gene expression levels was performed using Pearson correlation and Spearman-rho for samples with parametric and non-parametric distribution, respectively. The correlation coefficient $r \geq 0.7$ was interpreted as a strong correlation, coefficient $0.3 \leq r < 0.7$ as moderate correlation, $r < 0.3$ as weak correlation. R positive values refer to magnitudes proportional, while negative values were interpreted as inversely proportional quantities. Survival curves were made with the Kaplan-Meier method and differences in survival analyzed for significance by the log-rank test. Overall survival (OS) time was calculated as the interval between the surgery and day of death, in months.

All statistical calculations were performed using SPSS 20 software (SPSS, Chicago, IL, USA), with $p < 0.05$ being considered statistically significant.

RESULTS

CXCR7, *CXCR4*, *IDH1* and *HIF1 α* mRNA expressions in surgical astrocytoma specimens

The median expression of *CXCR7*, *CXCR4*, *IDH1* and *HIF1 α* mRNA were showed in table 1.

Table 1. Median relative expression in infiltrative astrocytomas

Gene	mRNA				Dunn's test
	NN	AGII	AGIII	GBM	<i>p</i>
<i>CXCR7</i>	20,68	70,24	72,89	92,48	<i>p</i> <0,0001
<i>CXCR4</i>	19,86	53,48	82,67	95,51	<i>p</i> <0,0001
<i>IDH1</i>	16,62	56,32	83,56	95,33	<i>p</i> <0,0001
<i>HIF1α</i>	15,00	56,64	102,33	91,72	<i>p</i> <0,0001

The median values of *CXCR7*, *CXCR4*, *IDH1* and *HIF1 α* showed significant difference between astrocytoma (AGII, AGIII and GBM) and NN brain tissue ($p < 0.0001$). Higher expression levels were observed in tumor samples. The *CXCR4*, *IDH1* and *HIF1 α* mRNA expression also was significantly different between AGII-AGIII and AGII-GBM Figure 1.

Associated mRNA expressions among *CXCR7*, *CXCR4*, *IDH1* and *HIF1 α* .

In AGII, we observed a significant correlation between *CXCR7* and *IDH1* expression ($r = 0.52$, $p = 0.008$) and also between *CXCR7* and *CXCR4* ($r = 0.41$, $p = 0.042$). However, no correlation was identified between the expressions of *CXCR7* and *HIF1 α* ($r = 0.12$, $p = 0.541$).

In GBM, on the other hand, a significant correlation between *CXCR7* and *IDH1* ($r = 0.50$, $p < 0.0001$) was observed. Also a correlation between *CXCR7* and *CXCR4* expressions ($r = 0.33$, $p = 0.002$), and a correlation between *CXCR7* and *HIF1 α* expressions ($r = 0.28$, $p = 0.008$) were observed. Figure 2.

HIF1α overexpression associates with *CXCR7* and *CXCR4* overexpressions

Patients with *HIF1α* hyperexpression presented higher *CXCR7* (7.94) and *CXCR4* (16.32) mRNA expressions than patients presenting *HIF1α* downregulated, who showed *CXCR7* mRNA median expression of 5.25 ($p=0.01$) and *CXCR4* of 6.54 ($p<0.0001$). Figure 3.

IDH1 mutation status and relative expressions of *CXCR7* and *CXCR4*

IDH1 mutation status was analyzed in 105 samples of diffuse infiltrative astrocytomas (19 AGII, 12 AGIII and 74 GBM). The R132H mutation was found in 30 samples distributed as follows: 16 AGII, 6 AGIII and 8 GBM. *CXCR7* and *CXCR4* mRNA expressions were respectively 4.26 and 4.66 among those presenting *IDH1mut*, while patients with *IDH1wild* presented *CXCR7* expression of 5.91 and 13.23 for *CXCR4* expression. Figure 4. The overview of *IDH1* mutation status and relative gene expression for AGII, AGIII and GBM are displayed as heatmap. Figure 5.

Immunohistochemistry and immunofluorescence

The analysis of *CXCR7* protein by immunohistochemistry staining was performed in 6 NN, 6 AGII, 6 AGIII and 7 GBM samples. The protein expression was identified in all selected samples. In AGII, *CXCR7* staining was present predominantly in tumor cells and almost absent from the endothelium of the tumor vasculature. In AGIII there was moderate labeling of the tumor cells and more intense labeling of the tumor vascular endothelial cells. While in GBM, there was intense staining of the tumor cells mainly in pseudopalisades nearest to necrotic areas and strong staining of the tumor endothelium. Figure 6.

Staining performed on the established cell line GBM (U87MG) showed protein expression located mostly in the cytoplasm, with minimal nuclear staining. Analysis of confocal microscopy showed that *CXCR7* was primarily associated with the plasma membrane. Figure 7.

Overall survival (OS)

OS in GBM patients had no significant differences for *CXCR7* ($p = 0.866$), *CXCR4* ($p = 0.228$), *IDH1* ($p = 0.553$) or *HIF1 α* ($p = 0.767$) mRNA expression levels comparing those above and under the median expression value for each gene; or when assessed in pairs comparing patients presenting hyperexpression of both genes with patients hypoexpressing these genes as: *CXCR7*⁺/*CXCR4*⁺ vs *CXCR7*/*CXCR4*⁻ ($p = 0.395$), *CXCR7*⁺/*IDH1*⁺ vs *CXCR7*/*IDH1*⁻ ($p = 0.052$) or *CXCR7*⁺/*HIF1 α* ⁺ vs *CXCR7*/*HIF1 α* ⁻ ($p = 0.625$). Figure 8.

DISCUSSION

Tumor microenvironment has proved increasingly relevant in the tumorigenic process and their components have been the focus of study as potential therapeutic targets adjuvants. The results of this study demonstrated that the chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, exhibit differential expression in diffusely infiltrating astrocytomas and their expressions associated with other factors such as HIF1 α and IDH1 may favor the process of malignant tumor.

The CXCR4 and CXCR7 mRNA expressions were significantly increased in astrocytomas compared to non-neoplastic brain tissue and a increase also was observed in parallel with malignancy. It was observed a significant association with CXCR7 and CXCR4 in AGII and in GBM. These findings corroborate previous descriptions in the literature as discussed below.

CXCR4 is the best characterized chemokine receptor in tumor cells and also is the only chemokine receptor identified on cancer stem cells (CSC). CXCR4⁺ CSC have been isolated from GBM and pancreatic carcinoma.^{30,31} CXCR7 is a recently deorphanized receptor for the chemokines CXCL12 (SDF-1) and CXCL11 (I-TAC).^{17,18} The chemokine receptors CXCR7 and CXCR4 contribute to tumorigenesis and play important roles in several common malignancies.^{14,15,21,32,33}

The CXCR7 is highly expressed in prostate tumors and the amount of expressed protein has been associated with tumor aggressiveness.³⁴ In breast and lung cancers, the CXCR7 promotes tumor growth.³⁵ Higher expression of CXCR7 has been associated with early and metastatic recurrence in non-small cell lung cancer.³⁶ Increased CXCR7 expression was also found in hepatocellular carcinoma tissues and it was related to invasion, angiogenesis and tumor growth.³⁷ High levels of CXCL12 expression were associated with poor overall and disease-free survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma.³⁸ Concomitant CXCR4 and CXCR7 expressions have predicted poor prognosis in renal cancer.¹⁴ High levels of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 were associated with poor overall survival and recurrence-free survival in renal cell carcinoma patients.³⁹

The CXCR7 protein expression showed a range from weakly positive in normal brain tissue, including endothelial cells, to a progressive immunostaining increase both in tumor and endothelial cells in parallel to the increase of malignancy. In GBM more intense labeling occurred primarily in pseudopalisading cells nearest necrosis and highly proliferating tumor

endothelium. Similar results were found in the literature from other tumors such as bladder, pancreas, and kidney.^{15,40,41} But is partly different from those available, with CXCR7 were found primarily in endothelial cells of normal brain and particularly in GBM tumor cells.¹⁶ In other different study CXCR7 was present in tumor cells of GBM and weakly in endothelium, nevertheless no staining was detected in low-grade glioma.¹³ The inconsistency data regarding the location of CXCR7 may be justified due to the small number of samples analyzed in these previous studies, unlike observed in a study of cancer of the cervix where CXCR7 was related to tumor size, lymph node involvement and disease-free interval.⁴² Interestingly GBM endothelial cells overexpressing CXCR7 and CXCL12 but not CXCR4.⁴³

The presence of CXCR7 protein on the cell membrane was showed unequivocally in U87MG cell line, as well as in the cytoplasm and also a thin marking at the core of some tumor cells. It's possible to speculate that the cell membrane receptor is internalized and there is protein traffic to the nucleus, corroborated by the observation of nuclear staining in the surgical samples. Description of similar traffic from the cell surface to the nucleus has been described for EGFR⁴⁴⁻⁴⁶, can be inferred by analogy to similar mechanisms for CXCR7. This observation deserves to be further investigated in future studies.

Hattermann et al.¹⁶ showed that *CXCR7* is highly expressed *in situ* on tumor endothelial, microglial and glioma cells whereas *CXCR4* has a much more restricted localization. These authors also demonstrated that *CXCR7* transcription significantly increased in high-grade astrocytomas as compared with normal brain tissues, and that tumor stem-like cell line preferentially expressed *CXCR4*, which diminished upon differentiation, whereas *CXCR7* increased drastically with differentiation. However, Calatuzzolo et al.¹³ showed significantly higher *CXCL11* and *CXCR4* mRNA expressions in GBM specimens compared to non-tumor controls or low-grade gliomas, but reported no differential expression for *CXCL12* and *CXCR7*.

In the present study, we observed a significant increase of *CXCR7* expression in astrocytomas when compared to non-neoplastic brain tissue together with significant increase of *CXCR4*, *IDH1* and *HIF1α* expressions. Of note, a significant differential *CXCR4* expression was detected between AGII and GBM that was two fold higher in GBM. In AGII we showed a significant associated expression of *CXCR7/CXCR4* and *CXCR7/IDH1*, while no association between *CXCR7/HIF1α* was reported. Association with *HIF1α* was significant only in GBM.

These findings allow us to speculate that hypoxia, more relevant in GBM, activates the expression of *HIF1α* and this modulates the expression of *CXCR4* and *CXCR7*, both related to the process of angiogenesis, marked a change in GBM. Increased expression of *CXCR7* in tumor endothelium GBM, demonstrated in this study, should contribute to this process of angiogenesis.

It has been well documented that activation of the HIF1 pathway may induce local expression of angiogenic factors, including CXCL12.^{47–49} Low oxygen concentration induces high expression of the *CXCR4* in different cell types and increases the recruitment of multiple populations of cells derived from the bone marrow.^{23,50,51} Moreover, *CXCR4* and *CXCR7* mRNA expressions have been demonstrated to be up-regulated by hypoxia in human microvascular endothelial cells.⁵² Knockdown of *HIF1α* in glioma cells significantly impaired the migration of tumor cells *in vitro* and their ability to invade the brain parenchyma *in vivo*.⁵³ Our results of *HIF1α* overexpression related to higher *CXCR7* and *CXCR4* expressions corroborate these previously reported data.

The frequency of *IDH1* mutation correlate strongly with the grade of astrocytoma. *IDH1* mutation was found in 84% of AGII, 50% of AGIII, and 10% of GBM in our series. *IDH1*mut related to a significantly lower expression of both receptors, *CXCR4* and *CXCR7*, but presented no significant impact on the expression of *HIF1α* corroborating previous observations by others.^{54,55} In fact, it have been demonstrated that 2HG, the oncometabolite generated by *IDH1* mutation, inhibits α-KG-dependent dioxygenases. These enzymes modulate several pathways, including sensitization to hypoxia, demethylation of histones and DNA, fatty acid metabolism and modifications of collagen, contributing to tumorigenesis. Furthermore, the presence of *IDH1* mutation has been tightly associated to CpG island methylator phenotype⁵⁶, and more recently it was shown that *IDH1* mutation only is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype⁵⁷. The induction of a methylated phenotype provides the molecular basis for the therapeutic response to alkylating agent as temozolomide⁵⁸. Therefore, the double hit of presence of *IDH1* mutation and *MGMT* gene methylation lead to a favorable impact on overall survival among low-grade gliomas.⁵⁹

The presence of *IDH1* mutation modulates to a minor increase in these expressions of *CXCR4* and *CXCR7*, possibly by epigenetic phenomena, less stimulus for angiogenesis and in this context may explain the better prognosis of patients with this type of mutation. Figure 9.

CONCLUSION

This study showed that *CXCR7* gene differentially expressed in astrocytomas, protein expression levels correlate with the degree of malignancy. Overexpression *HIF1 α* relates with higher expressions of *CXCR7* and *CXCR4*, otherwise *IDH1mut* relates with lower expressions.

CXCR7 might play an additional role in the tumorigenesis of astrocytomas and further studies to elucidate its mechanistic function would be worthwhile.

REFERENCES

1. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-oncology*. 2012;14 Suppl 5:v1–v49. doi:10.1093/neuonc/nos218.
2. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(3):215–225; discussion 226–229.
3. Janny P, Cure H, Mohr M, et al. Low grade supratentorial astrocytomas. Management and prognostic factors. *Cancer*. 1994;73(7):1937–1945.
4. Keles GE, Lamborn KR, Berger MS. Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome. *J Neurosurg*. 2001;95(5):735–745. doi:10.3171/jns.2001.95.5.0735.
5. Leighton C, Fisher B, Bauman G, et al. Supratentorial low-grade glioma in adults: an analysis of prognostic factors and timing of radiation. *J Clin Oncol*. 1997;15(4):1294–1301.
6. Schomas DA, Laack NNI, Rao RD, et al. Intracranial low-grade gliomas in adults: 30-year experience with long-term follow-up at Mayo Clinic. *Neuro-oncology*. 2009;11(4):437–445. doi:10.1215/15228517-2008-102.
7. Chang EF, Smith JS, Chang SM, et al. Preoperative prognostic classification system for hemispheric low-grade gliomas in adults. *J Neurosurg*. 2008;109(5):817–824. doi:10.3171/JNS/2008/109/11/0817.
8. Van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, et al. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet*. 2005;366(9490):985–990. doi:10.1016/S0140-6736(05)67070-5.
9. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987–996. doi:10.1056/NEJMoa043330.

10. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):540–550. doi:10.1038/nrc1388.
11. Gerber PA, Hippe A, Buhren BA, Müller A, Homey B. Chemokines in tumor-associated angiogenesis. *Biol Chem*. 2009;390(12):1213–1223. doi:10.1515/BC.2009.144.
12. Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol*. 2006;79(4):639–651. doi:10.1189/jlb.1105633.
13. Calatuzzolo C, Canazza A, Pollo B, et al. Expression of the new CXCL12 receptor, CXCR7, in gliomas. *Cancer Biol Ther*. 2011;11(2):242–253.
14. D’Alterio C, Consales C, Polimeno M, et al. Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10(7):772–781.
15. Gebauer F, Tachezy M, Effenberger K, et al. Prognostic impact of CXCR4 and CXCR7 expression in pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Oncol*. 2011;104(2):140–145. doi:10.1002/jso.21957.
16. Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, et al. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res*. 2010;70(8):3299–3308. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3642.
17. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35760–35766. doi:10.1074/jbc.M508234200.
18. Burns JM, Summers BC, Wang Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*. 2006;203(9):2201–2213. doi:10.1084/jem.20052144.
19. Arvidsson Y, Bergström A, Arvidsson L, Kristiansson E, Ahlman H, Nilsson O. Hypoxia stimulates CXCR4 signalling in ileal carcinoids. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(2):303–316. doi:10.1677/ERC-09-0085.

20. Liu H, Xue W, Ge G, et al. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 α in MSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401(4):509–515. doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.076.
21. Liu Y-L, Yu J-M, Song X-R, Wang X-W, Xing L-G, Gao B-B. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia-inducible factor in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(10):1320–1326.
22. Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol Cancer.* 2010;9:17. doi:10.1186/1476-4598-9-17.
23. Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med.* 2003;198(9):1391–1402. doi:10.1084/jem.20030267.
24. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807–1812. doi:10.1126/science.1164382.
25. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009;462(7274):739–744. doi:10.1038/nature08617.
26. Göttle P, Kremer D, Jander S, et al. Activation of CXCR7 receptor promotes oligodendroglial cell maturation. *Ann Neurol.* 2010;68(6):915–924. doi:10.1002/ana.22214.
27. Valente V, Teixeira SA, Neder L, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol.* 2009;10:17. doi:10.1186/1471-2199-10-17.
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
29. Uno M, Oba-Shinjo SM, Silva R da, et al. IDH1 mutations in a Brazilian series of Glioblastoma. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(1):163–165.

30. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):313–323. doi:10.1016/j.stem.2007.06.002.
31. Ehtesham M, Mapara KY, Stevenson CB, Thompson RC. CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Lett*. 2009;274(2):305–312. doi:10.1016/j.canlet.2008.09.034.
32. Salmaggi A, Maderna E, Calatuzzolo C, et al. CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression in brain metastases. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(17):1608–1614.
33. Hartmann TN, Burger M, Burger JA. The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004;18(2):126–130.
34. Wang J, Shiozawa Y, Wang J, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2008;283(7):4283–4294. doi:10.1074/jbc.M707465200.
35. Miao Z, Luker KE, Summers BC, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(40):15735–15740. doi:10.1073/pnas.0610444104.
36. Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, et al. Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2009;115(11):2580–2593. doi:10.1002/cncr.24281.
37. Zheng K, Li H-Y, Su X-L, et al. Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:31. doi:10.1186/1756-9966-29-31.
38. Liang JJ, Zhu S, Bruggeman R, et al. High levels of expression of human stromal cell-derived factor-1 are associated with worse prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(10):2598–2604. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0405.

39. Wang L, Chen W, Gao L, et al. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2012;10(1):212. doi:10.1186/1477-7819-10-212.
40. Hao M, Zheng J, Hou K, et al. Role of chemokine receptor CXCR7 in bladder cancer progression. *Biochem Pharmacol*. 2012;84(2):204–214. doi:10.1016/j.bcp.2012.04.007.
41. Maishi N, Ohga N, Hida Y, et al. CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. *Pathol Int*. 2012;62(5):309–317. doi:10.1111/j.1440-1827.2012.02792.x.
42. Schrevel M, Karim R, ter Haar NT, et al. CXCR7 expression is associated with disease-free and disease-specific survival in cervical cancer patients. *Br J Cancer*. 2012;106(9):1520–1525. doi:10.1038/bjc.2012.110.
43. Takano S, Yamashita T, Ohneda O. Molecular therapeutic targets for glioma angiogenesis. *J Oncol*. 2010;2010:351908. doi:10.1155/2010/351908.
44. Wang Y-N, Hung M-C. Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci*. 2012;2(1):13. doi:10.1186/2045-3701-2-13.
45. Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med*. 2011;12(66):419–432.
46. Wang S-C, Hung M-C. Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clin Cancer Res*. 2009;15(21):6484–6489. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2813.
47. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. “Pseudopalisading” necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(6):529–539.
48. Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(3):694–705. doi:10.1172/JCI40283.

49. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004;10(8):858–864. doi:10.1038/nm1075.
50. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003;9(6):677–684. doi:10.1038/nm0603-677.
51. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest.* 2006;86(12):1221–1232. doi:10.1038/labinvest.3700482.
52. Schutyser E, Su Y, Yu Y, et al. Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. *Eur Cytokine Netw.* 2007;18(2):59–70. doi:10.1684/ecn.2007.0087.
53. Mendez O, Zavadil J, Esencay M, et al. Knock down of HIF-1? in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. *Mol Cancer.* 2010;9:133. doi:10.1186/1476-4598-9-133.
54. Metellus P, Colin C, Taieb D, et al. IDH mutation status impact on in vivo hypoxia biomarkers expression: new insights from a clinical, nuclear imaging and immunohistochemical study in 33 glioma patients. *J Neurooncol.* 2011;105(3):591–600. doi:10.1007/s11060-011-0625-2.
55. Williams SC, Karajannis MA, Chiriboga L, Golfinos JG, von Deimling A, Zagzag D. R132H-mutation of isocitrate dehydrogenase-1 is not sufficient for HIF-1 α upregulation in adult glioma. *Acta Neuropathol.* 2011;121(2):279–281. doi:10.1007/s00401-010-0790-y.
56. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010;17(5):510–522. doi:10.1016/j.ccr.2010.03.017.
57. Turcan S, Rohle D, Goenka A, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 2012;483(7390):479–483. doi:10.1038/nature10866.

58. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997–1003. doi:10.1056/NEJMoa043331.
59. Leu S, von Felten S, Frank S, et al. IDH/MGMT-driven molecular classification of low-grade glioma is a strong predictor for long-term survival. *Neuro-oncology*. 2013;15(4):469–479. doi:10.1093/neuonc/nos317.
60. Lazarini F, Tham TN, Casanova P, Arenzana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia*. 2003;42(2):139–148. doi:10.1002/glia.10139.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. (A) *CXCR7*, (B) *CXCR4*, (C) *IDH1* and (D) *HIF1α* mRNA expression in 22 non-neoplastic tissues, 25 AGII, 18 AGIII and 86 GBM assessed by qRT-PCR. Higher expression levels were observed in tumor samples (** $p < 0.0001$). The median *CXCR4* mRNA expression between GBM and AGII was also significantly different (** $p = 0.0029$).

Figure 2. Correlation between *CXCR7* and *CXCR4*, *HIF1α* and *IDH1* expression levels in diffusely infiltrative astrocytomas. Correlation was assessed in AGII and GBM cases. *CXCR7* expression level was correlated to *CXCR4* and *IDH1* in AGII and with *CXCR4*, *IDH1* and *HIF1α* expression levels in GBM. The significant correlations are shown in black and the non-significant in grey. r correlation coefficient assessed by Spearman-rho test.

Figure 3. Impact of *HIF1α* in *CXCR7* and *CXCR4* mRNA expression showing a higher value *CXCR7* and *CXCR4* in patients with overexpression of *HIF1α*.

Figure 4. (A) *CXCR7*, (B) *CXCR4* and (C) *HIF1α* mRNA expression according *IDH1* mutation status. Patients with *IDH1*mut presented lower *CXCR7* and *CXCR4* expressions than *IDH1*wild.

Figure 5. Heatmap displaying the relative gene expressions in astrocytomas (grade II, grade III and GBM) cases according to *IDH1* mutation status. Samples with an *IDH1* mutation are indicated by black lines and samples with no *IDH1* mutation are indicated by gray lines. Each mark was code as red if overexpression and green if downregulated. The *IDH1*mut cases showed lower expression levels of *CXCR7* and *CXCR4* mRNA.

Figure 6. Immunohistochemistry of *CXCR7*. Representative examples of NN tissue sample with weak nuclear staining and absence of endothelial marking; AGII - tumors cells presenting predominantly cytoplasmatic staining, and weak labeling of tumor endothelium; AGIII - tumor cells with cytoplasmatic and nuclear staining and moderate labeling of tumor endothelium, and

GBM - atypical tumor cells and proliferated endothelium cells presenting strong labeling (IHC 400x).

Figure 7. Confocal microscopy of CXCR7 (green fluorescence) in U87MG. DAPI was used for nuclear detection.

Figure 8. Kaplan–Meier analysis samples of overall survival (OS) for patients with GBM. (A) CXCR7⁺ vs CXCR7⁻; (B) CXCR4⁺ vs CXCR4⁻; and, (C) CXCR7⁺/CXCR4⁺ vs CXCR7⁻/CXCR4⁻.

Figure 9. Diagram illustrating possible mechanistic function of *CXCR7* and *CXCR4* expressions levels with *IDH1* mutation and *HIF1α* expression. IDHs enzymes normally catalyze the oxidative decarboxylation of isocitrate to α-KG which plays important role in the degradation of HIF-1α. *IDH1* mutant exhibits a gain of function by catalyzing the production of 2-HG. High levels of this oncometabolite inhibit α-KG dependent dioxygenases. The inhibition of TET2 hydroxylases and histone demethylases probably leads to increased DNA hypermethylation. This induces a methylator phenotype that could exert an epigenomic inhibitory effect on *CXCR7/CXCR4*. The 2-HG also influences HIF in some conditions (hypoxic), inhibition of prolyl hydroxylases (PHDs) can lead to increased levels of HIF downstream. Binding to the hypoxia response element (HRE), inducing the transcriptional activity of genes. Biological effects of *CXCR4/CXCR7* are mediated by activation of GPCR. Upon ligand binding activates PI3K, MAPK, Akt, PKA pathways.

Figure1

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

Figure2

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

Figure3

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

Figure4

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

Figure5

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

Figure6

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

Figure7

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

Figure8

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

Figure9

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

10.2 Artigos publicados

CLINICS 2011;66(1):163-165

DOI:10.1590/S1807-59322011000100028

RAPID COMMUNICATION

IDH1 mutations in a Brazilian series of Glioblastoma

Miyuki Uno,^I Sueli Mieko Oba-Shinjo,^I Roseli da Silva,^I Flavio Miura,^I Carlos Afonso Clara,^{IV} José Reynaldo Walther de Almeida,^{IV} Suzana M. F. Malheiros,^V André Macedo Bianco,^{VII} Reynaldo Brandt,^{VIII} Guilherme Carvalho Ribas,^{VIII} Halim Feres,^{VIII} Carlos Dzik,^{III} Sérgio Rosemberg,^{II} João Norberto Stavale,^{VI} Manoel Jacobsen Teixeira,^I Suely K. N. Marie^I

^I Department of Neurology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ^{II} Department of Pathology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ^{III} Cancer Institute of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil. ^{IV} Barretos Cancer Hospital (Fundação Pio XII), Barretos, São Paulo, Brazil. ^V Department of Neurology, School of Medicine, Federal University of São Paulo, Brazil. ^{VI} Department of Pathology, School of Medicine, Federal University of São Paulo, Brazil. ^{VII} Nove de Julho Hospital, São Paulo, Brazil. ^{VIII} Albert Einstein Jewish Hospital, São Paulo, Brazil.

Email: unomiyuki@lim15.fm.usp.br
Tel.: 55 11 3061-7471

INTRODUCTION

Diffusely infiltrating astrocytomas are the most common primary brain tumors in adults, being classified into four grades according to the World Health Organization (WHO).¹ Glioblastoma (GBM), grade IV astrocytoma, is the most frequent,² and presents median survival rarely exceeding 12 months in spite of currently available treatment approaches.³ GBM may manifest rapidly *de novo* (primary GBM), or may develop slowly from grade II or grade III astrocytomas (secondary GBM), suggesting that they are distinct disease entities that evolve through different genetic pathways.

In recent genome-wide analyses, high rates of spontaneous mutations in the gene encoding cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase 1 (*IDH1*) have been reported in diffuse gliomas including WHO grades II and III astroglial and oligodendroglial lineages.⁴⁻⁸ Mutations of *IDH1* are rare in primary GBM (<10%) and frequent in secondary GBM (>80%).^{4-7,9-11} Thus, *IDH1* mutations are strong predictors of more favorable prognosis and a highly selective molecular marker of secondary GBM that complements clinical criteria for distinguishing them from primary GBM. Intriguingly, mutations of *IDH1* predominantly occurred in younger patients and were preferentially found in tumors harboring *TP53* mutations.¹² These results corroborate the fact that primary and secondary GBMs originate from different progenitor cells.

IDH1, located on 2q33.3, encodes the cytosolic NADP⁺ specific isocitrate dehydrogenase, which catalyzes the oxidative decarboxylation of isocitrate to α -ketoglutarate.¹³ *IDH1* is configured as a homodimer with two enzymatically active sites, and most of its activity is detected in the cytosol and in peroxisomes. The other four members of the *IDH* family are exclusively localized in mitochondria.¹⁴ Glioma-specific mutations in *IDH1* always affect the amino acid arginine 132 located in an evolutionarily highly conserved region at the binding site for isocitrate.¹¹ Mutations in *IDH1*

are of somatic origin and heterozygous, and inactivate enzyme activity.⁷

We studied the frequency of *IDH1* mutations in a series of 161 GBM patients from the Brazilian population according to patient age, gender, GBM type and survival time.

Tumor samples were collected during surgical procedures by the Neurosurgery Groups of different institutions from the state of São Paulo: 93 from Hospital das Clínicas, School of Medicine of University of São Paulo; 38 from Barretos Cancer Hospital; 13 from Paulista School of Medicine, Federal University of São Paulo; 10 from Albert Einstein Jewish Hospital; and 7 from Nove de Julho Hospital. Informed consent was obtained from each patient, and the study was approved by the local ethics committee. The samples included frozen tissues, collected upon surgical removal and immediately snap-frozen in liquid nitrogen¹⁵ and paraffin-embedded blocks. The mean age of 161 GBM patients was 56 years, with 59 females and 102 males. A total of 155 cases were primary GBMs (mean age 55 years), and 6 cases were diagnosed as secondary GBM (mean age 31 years) with histological evidence of a previous less malignant astrocytoma.

DNA was extracted from the frozen tissues by a standard phenol/chloroform method or by Trizol (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions, and by QiaAmp DNA Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) from paraffin-embedded sections.

Polymerase chain reaction (PCR) followed by DNA sequencing was applied to detect *IDH1* mutation. Primers sequences synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies, Inc, Coralville, IA, USA) for PCR amplification of exon 4 were (5'-3'): CCATCACTGCAGTTGTAGGTT and CATAACAAGTTGGAAATTTCTGG. PCR products were generated in a 25 μ L reaction mixture including 100 ng of DNA, 50 mM KCl, 50 μ M of each dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol of each primer and 1 unit of Taq DNA polymerase (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). The PCR was performed with an initial denaturing step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles consisting of 94°C for 30 s, 54°C for 30 s and at 72°C for 30 s. After the final cycle, an extension period of 10 min at 72°C was performed. The PCR products (436 bp) of amplification were checked, purified with a GFX column (GE Healthcare) and sequenced on an ABI Prism 3130 DNA automated sequencer using the

Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers used for the sequencing were the same as those used for PCR. Results were analyzed and compared with the public sequence of *IDH1* cDNA (GenBank), accession no. NM_005896.

The statistical analyses and their associations with patient characteristics were performed by chi-square test (χ^2). Overall survival (OS) was calculated as the interval between the surgery and day of death, in months. The log-rank test was used for univariate analysis to estimate differences in survival time for *IDH1* mutation status, according to the Kaplan–Meier method. Calculations were performed using STATA, version 7 (STATA Corp., College Station, TX, USA) and SPSS 15.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA), with statistical significance of $p < 0.05$.

We found *IDH1* mutations in 11.8% (19 out of 161) of samples tested, with a higher mutation rate in GBMs diagnosed as secondary, 66.7% (4 out of 6), than in cases of primary GBMs, 9.7% (15 out of 155), $p < 0.001$. All mutations were heterozygous, located at codon 132, resulting in amino acid change from arginine to histidine. We found a higher frequency of *IDH1* mutation in females (18.6%) than in males (7.8%) ($p = 0.041$). GBM patients carrying *IDH1* mutations were significantly younger (diagnosed before age 50 years), mean age of 44 years, than patients with wild-type *IDH1* (diagnosed at age 50 years or older), mean age of 56 years, $p = 0.011$ (Table 1). The mean survival time of all GBM patients with and without *IDH1* mutations was 12 months (19 cases) and 9 months (142 cases), respectively ($p = 0.075$, log-rank test), as shown in Figure 1.

DISCUSSION

A higher rate of *IDH1* mutation in secondary compared with primary GBM cases (66.7% vs. 9.7%) was observed in our study. Additionally, patients carrying *IDH1* mutations were younger (44 years) than those patients without the mutation (56 years), and *IDH1* status has been shown to have an association trend with an increase in the overall survival of GBM patients, as described by others.^{4-7,9-12} The lack of statistical impact of the overall survival time might be attributed to a low number of cases with *IDH1* mutation reflecting a low incidence of secondary GBM in our series.

Figure 1 - Survival of glioblastoma patients according to their *IDH1* mutation status (positive vs. negative). Glioblastoma patients carrying an *IDH1* mutation had longer overall survival (log-rank test; Mantel–Cox test; $p = 0.075$).

We have also previously reported a low prevalence of *TP53* mutations, usually detected among secondary GBM cases, because of a higher frequency of primary GBM in our series.¹⁶ Both results concerning *TP53* and *IDH1* mutation status point out the molecular differences between primary and secondary GBM. These results reinforce the concept that, despite the histological similarities, primary and secondary GBMs are genetically and clinically distinct entities.^{6,12}

In summary, this study established the frequency of *IDH1* mutation in a Brazilian series of GBM, confirmed *IDH1* mutation as a genetic marker for secondary GBM, and therefore as complementary information to help predict the outcome of patients with GBM.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process #04/12133-6), the Ludwig Institute for Cancer Research, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Albert Einstein Jewish Hospital. We sincerely thank the neurosurgeons from the participating institutions for the therapeutic and diagnostic

Table 1 - *IDH1* mutation status of glioblastomas according to age, gender and tumor subtype in Brazilian patients.

Characteristics	GBM patients (%)	<i>IDH1</i> mutation		%	<i>p</i> value
		Positive*	Negative		
	161	19	142	11.8	
Gender					
Female	59 (36.7)	11	48	18.6	0.041
Male	102 (63.3)	8	94	7.8	
Age at diagnosis (years)					
<50	52 (32.3)	11	41	21.1	0.011
≥50	109 (67.7)	8	101	7.3	
(Age, mean ± SE)	54.6 ± 13.4	43.9 ± 19.1	56.1 ± 11.9		
Tumor subtype					
Primary	155 (96.3)	15	140	9.7	<0.001
Secondary	6 (3.7)	4	2	66.7	

**IDH1* mutation at R132H in heterozygous form.

CLINICS 2011;66(1):163-165

IDH1 mutations in a Brazilian series of Glioblastoma
Uno M et al.

procedures of all patients included in this study. We also thank the Psychiatry Institute for the logistical help in the surgical therapy at USP-SP, and Diagnostika Laboratory for preparation of paraffin-embedded material from Albert Einstein Jewish Hospital and Nove de Julho Hospital.

REFERENCES

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109, doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- von Deimling A, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD. Astrocytic gliomas: characterization on a molecular genetic basis. *Recent Results Cancer Res.* 1994;33-42.
- Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age <50 years. *Cancer.* 2005;104:825-32, doi: 10.1002/cncr.21221.
- Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008;116:597-602, doi: 10.1007/s00401-008-0455-2.
- Ichimura K, Pearson DM, Kocalkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DT, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but are rare in primary glioblastomas. *Neurol Oncol.* 2009;11:341-7, doi: 10.1215/15228517-2009-025.
- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009;174:1149-53, doi: 10.2353/ajpath.2009.080958.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360:765-73, doi: 10.1056/NEJMoa0808710.
- Gravendeel LA, Kloosterhof NK, Bralten LB, van Marion R, Dubbink HJ, Dinjens W, et al. Segregation of non-p.R132H mutations in IDH1 in distinct molecular subtypes of glioma. *Hum Mutat.* 2010;31:E1186-99, doi: 10.1002/humu.21201.
- Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, et al. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat.* 2009;30:7-11, doi: 10.1002/humu.20937.
- Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Seo SJ, et al. Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer.* 2009;125:353-5, doi: 10.1002/ijc.24379.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321:1807-12, doi: 10.1126/science.1164382.
- Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6002-7, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0715.
- Narahara K, Kimura S, Kikkawa K, Takahashi Y, Wakita Y, Kasai R, et al. Probable assignment of soluble isocitrate dehydrogenase (IDH1) to 2q33.3. *Hum Genet.* 1985;71:37-40, doi: 10.1007/BF00295665.
- Geisbrecht BV, Gould SJ. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+) dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1999;274:30527-33, doi: 10.1074/jbc.274.43.30527.
- Oba-Shinjo SM, Bengtson MH, Winnischofe SMB, Colin C, Vedoy CG, Mendonça Z, et al. Identification of novel differentially expressed genes in human astrocytomas by cDNA representational difference analysis. *Mol Brain Res.* 2005;140:25-33, doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.06.015.
- Uno M, Oba-Shinjo SM, de Aguiar PH, Leite CC, Rosenberg S, Miura FK, et al. Detection of somatic TP53 splice site mutations in diffuse astrocytomas. *Cancer Lett.* 2005;224:321-7, doi: 10.1016/j.canlet.2004.10.022.

Low-grade astrocytoma – surgical outcomes in eloquent versus non-eloquent brain areas

Astrocitoma de baixo grau – resultado cirúrgico em área eloquente versus não eloquente

André de Macedo Bianco¹, Flavio Key Miura², Carlos Clara³, Jose Reynaldo W. Almeida³, Clemar Correa da Silva², Manoel Jacobsen Teixeira², Suely K. Nagahashi Marie²

ABSTRACT

A retrospective study of 81 patients with low-grade astrocytoma (LGA) comparing the efficacy of aggressive versus less aggressive surgery in eloquent and non-eloquent brain areas was conducted. Extent of surgical resection was analyzed to assess overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). Degree of tumor resection was classified as gross total resection (GTR), subtotal resection (STR) or biopsy. GTR, STR and biopsy in patients with tumors in non-eloquent areas were performed in 31, 48 and 21% subjects, whereas in patients with tumors in eloquent areas resections were 22.5, 35 and 42.5%. Overall survival was 4.7 and 1.9 years in patients with tumors in non-eloquent brain areas submitted to GTR/STR and biopsy ($p=0.013$), whereas overall survival among patients with tumors in eloquent area was 4.5 and 2.1 years ($p=0.33$). Improved outcome for adult patients with LGA is predicted by more aggressive surgery in both eloquent and non-eloquent brain areas.

Key words: astrocytoma, survival analysis, neurosurgery.

RESUMO

Foi realizado estudo retrospectivo em 81 pacientes com astrocitoma de baixo grau (LGA) comparando a eficácia da ressecção cirúrgica com cirurgia menos agressiva em relação à área eloquente e não eloquente do cérebro. A extensão da ressecção cirúrgica foi analisada para avaliar a sobrevida geral (OS) e o tempo livre de doença (PFS). O grau da ressecção cirúrgica foi classificado como ressecção total (GTR), subtotal (STR) e biópsia. Nos pacientes com lesão em área não eloquente foram realizadas GTR, STR e biópsia em 31, 48 e 21% dos casos, enquanto, naqueles com lesão em área eloquente, em 22,5, 35 e 42,5%, respectivamente. A sobrevida geral foi de 4,7 e 1,9 anos em pacientes com lesões em área não eloquente submetidos à GTR/STR e biópsia ($p=0,013$). Nos pacientes com lesão em áreas eloquentes, a sobrevida geral foi de 4,5 e 2,1 anos ($p=0,33$), respectivamente. A extensão da ressecção é fator preditivo de sobrevida tanto nas lesões em áreas eloquentes quanto nas não eloquentes.

Palavras-Chave: astrocitoma, análise de sobrevida, neurocirurgia.

Primary central nervous system (CNS) tumors comprise a heterogeneous group of benign and malignant neoplasms. The most common tumors are collectively referred to as gliomas. These tumors are classified according to cell origin and graded based on standard histopathological features defined by the World Health Organization (WHO) — Classification of Tumors of the Central Nervous System (latest 2007 edition)^{1,2}.

Diffuse low-grade gliomas (LGGs), designated as WHO grade II classification, encompass glial tumors that are infiltrative in nature with low proliferative activity, including astrocytomas, oligodendrogliomas and mixed oligoastrocytomas.

An estimated 2,000 to 3,000 LGGs are diagnosed in the United States every year, accounting for nearly 15% of all

primary brain tumors. These cases are predominantly astrocytomas. Peak incidence occurs in individuals between 35 and 44 years of age³. The median survival of patients with LGG is between five and ten years⁴⁻¹¹. Despite this long survival time, 50–75% of these patients die as a result of either tumor recurrence or malignant progression^{6,11}.

Whereas expectant management was once acceptable, current trends and mounting evidence now favor more active management, including extensive surgical resection¹²⁻¹⁵. Nevertheless, studies tend to compare survival in good surgical candidates (especially those with tumors in non-eloquent brain areas) with survival in poor surgical candidates (with diffuse infiltrating tumors in eloquent brain areas)⁷.

¹Post-graduate student, Department of Neurology, Universidade de São Paulo (USP) Medical School, São Paulo SP, Brazil;

²Department of Neurology, Hospital das Clínicas, USP Medical School, São Paulo SP, Brazil;

³Department of Neurology and Neurosurgery, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos SP, Brazil.

Correspondence: André de Macedo Bianco; Rua Peixoto Gomide 515 / conj. 84; 01409-001 São Paulo SP - Brasil; E-mail: ambbr@uol.com.br

Conflict of interest: There is no conflict of interest to declare.

Received 19 December 2012; Received in final form 23 August 2012; Accepted 30 August 2012

We performed a retrospective study in a homogeneous series of LGG, consisting of adult pure diffuse astrocytoma (WHO grade II), comparing the efficacy of aggressive versus less aggressive surgery in patients with tumors in eloquent and non-eloquent brain areas.

METHODS

Adult patients who underwent initial surgery at Hospital das Clínicas de São Paulo and Hospital de Câncer de Barretos Pio XII for hemispheric low-grade astrocytoma (LGA) between 1999 and 2008 were selected. The histopathological diagnosis of LGA was based on WHO guidelines, and the revision was performed by one neuropathologist for all cases included from both institutions. Oligodendroglioma and mixed glioma were excluded, as were two cases of gliomatosis cerebri.

Clinical data including age and sex, initial symptoms, tumor location, extent of surgical resection, adjuvant therapy, date of last follow-up or contact, date of death, time interval for disease progression and overall survival time were analyzed to assess outcome measures: overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). Overall survival was defined as the time from surgery to death and progression-free survival as time from surgery to demonstration of unequivocal increase in tumor size or demonstration of gadolinium enhancement on follow-up imaging and/or higher-grade tumor on subsequent surgery or biopsy¹². Patients with no known progression/malignant progression were censored as of their last scan date.

Based on the data collected, patients were organized into two groups: tumor in non-eloquent brain area and tumor in eloquent brain area when lesion involved one or more of the following: internal capsule, insula, basal ganglia, language cortex, sensory motor cortex, thalamus and hypothalamus.

Outpatients were followed-up every three months. Semianually sequential follow-up neuroimages were compared by neurosurgeons, excluding the surgeon who carried out the operation, to determine the presence of residual lesion and recurrence or malignant progression of the tumor. The degree of tumor resection was classified as: (1) gross total resection (GTR) when complete resection of the lesion was achieved based on Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR) signal abnormality on magnetic resonance imaging (MRI); (2) subtotal resection (STR) when residual FLAIR signal abnormality was detected on postoperative images; and (3) biopsy for either open or stereotactic procedures.

Postoperative limited-radioterapy, with or without adjuvant chemotherapy, was delivered to the patients with progression/malignization and those with high risk (over 40 years, tumor crossing midline, partial resection). Total dose was 54 Gy with fractions of 2 Gy each. Adjuvant drugs were lomustine or temozolomide.

The survival curves were constructed using the Kaplan-Meier method and differences were evaluated using the

Log-rank test. The other parameters were analyzed by multivariate analysis using Cox proportional hazards. Statistical tests were performed using the R platform, version 2.8.0 (Copyright © 2008 The R Foundation for Statistical Computing) and SPSS 15.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA), with $p < 0.05$ being considered statistically significant.

The ethics committees for human research of both institutions approved this study.

RESULTS

Among the 82 patients who met the inclusion criteria, 47 (57%) were male, and patient age ranged from 18 to 69 years old (median of 37 yo). Epilepsy was the most frequent symptom, followed by headache and cognitive and motor changes.

Nineteen (23%) patients were followed-up for less than two years, 22 (27%) patients were followed-up for a period between 3 and 4 years, 31 (38%) patients were followed-up for a period between 4 and 8 years and 10 (12%) patients were followed-up for more than 8 years (median of 4.8 years). Thirty-four (41%) patients died during the follow-up period. Tumor progression and/or malignant degeneration were detected in 47 (57%) patients with a median time of 2 years. Of this group, 14 patients (30%) were still alive. LGAs primarily occurred in non-eloquent areas in 42 (51%) cases while in eloquent areas in 40 (49%) cases (Table).

Table. Patient and treatment characteristics (n=82).

Characteristics	Non-eloquent	Eloquent*
Age at diagnosis (years)		
18–30	14	13
31–40	12	13
41–50	10	8
>51	6	6
Median	37	37
Sex		
Male	27	20
Female	15	20
KPS at diagnosis		
100–90%	28	30
80–70%	9	7
60–50%	5	3
Extent of resection		
GTR	13	9
STR	20	14
Biopsy	9	17
Post-operative adjuvant therapy		
Radiotherapy		
Yes	30	31
No	10	11
Chemotherapy		
Yes	4	8
No	38	32

KPS: Karnofsky Performance Scale; GTR: gross total resection; STR: subtotal resection.

*Tumor involved one or more of the following: internal capsule, insula, basal ganglia, language cortex, sensory motor cortex, thalamus and hypothalamus.

A total of 58 (70%) patients had a Karnofsky score (KPS) of 100/90 at diagnosis, while 24 (30%) patients had a KPS ≤ 80.

Multivariate cox regression assessments (KPS, age, sex, tumor location) revealed that KPS at diagnosis was an independent predictive factor of both OS (hazard ratio=0.31; 95%CI 0.135–0.71; $p=0.006$) and PFS (hazard ratio=0.167; 95%CI 0.057–0.492; $p=0.001$).

GTR, STR and biopsy in patients with tumors in non-eloquent areas were performed in 13 (31%), 20 (48%) and 9 (21%) subjects respectively, while for patients with tumors in eloquent areas resections were 9 (22.5%), 14 (35%) and 17 (42.5%), respectively.

Overall survival time was 4.7 and 1.9 years in patients with tumors in non-eloquent brain areas that had GTR/STR and biopsy, respectively ($p=0.013$). For patients with tumors in eloquent areas undergoing GTR/STR and biopsy, OS was 4.5 and 2.1 years, respectively ($p=0.33$). (Figs. 1 and 2)

A permanent new neurological deficit determined by the surgical procedure occurred in four (5%) cases and surgical infection occurred in two cases (2%). There was no operative mortality.

DISCUSSION

Safety concerns over treatment for patients with low-grade gliomas have not yet been sufficiently resolved to reach a consensus opinion and rational standard of care. Extent of surgical resection, timing for adjuvant radiotherapy and indication of chemotherapy for hemispheric LGG are aspects of clinical management, which remain controversial. Small study size, heterogeneity of inclusion criteria, distinct demographic series and different histological types of tumor were some of the confounding parameters preventing a consensus on the optimal therapeutic approach in this patient group^{4,13,16}.

A retrospective review of 216 patients with hemispheric LGG, including volumetric analysis of the extent of surgical resection, has shown that patients with at least 90% resection had 5- and 8-year OS of 97 and 91%, respectively, whereas patients with less than 90% resection had 5- and 8-year OS rates of 76 and 60%, respectively¹².

Chang et al.¹⁷ proposed a preoperative score system to prognosticate long-term outcomes in patients with LGGs that was validated in a subsequent multi-institutional study¹⁸. This newer scoring system is unique in that it is the first system to consider eloquence as a poor independent prognostic factor.

We share the view of Kelly⁷ that surgeons tend to opt for more extensive resection of compact tumors, especially those in non-eloquent brain areas, while subjecting diffuse infiltrating tumors in eloquent brain areas to biopsy only. In spite of this evidence, some patients with tumors in non-eloquent area (generally asymptomatic) are indicated for biopsy as primary therapy.

In the present study, we focused the analysis on astrocytoma among the LGGs, excluding pilocytic astrocytomas (WHO Grade I), oligodendroglioma and gliomas with mixed histology. Our results showed that higher KPS at diagnosis and GTR/STR were positive predictive factors for overall survival.

Patients with tumors in non-eloquent brain areas undergoing biopsy have shorter overall survival time than those submitted to GTR/STR. Similarly, patients with tumors in eloquent areas undergoing biopsy have shorter survival than those submitted to GTR/STR although this difference did not reach statistical significance.

Although our results for patients with tumors in eloquent areas were not statistically significant, there is cumulative evidence that GTR at initial diagnosis represents a positive prognostic factor, even in cases with incomplete tumor

OS: overall survival; GTR: gross total resection; STR: subtotal resection.

Fig 1. Kaplan Mayer – extent of resection and overall survival (months) of patients with tumors in non-eloquent brain area.

OS: overall survival; GTR: gross total resection; STR: subtotal resection.

Fig 2. Kaplan Mayer – extent of resection and overall survival (months) of patients with tumors in eloquent brain area.

removal, as patients with more extensive tumor resection had significantly longer OS^{11,14-16,19,20}.

Our data showed a very similar KPS at diagnosis between these two groups. Although volumetric analysis of preoperative lesions was not performed systematically in the present series, larger lesions were associated with lower KPS at diagnosis which proved to be an independent predictive factor of OS.

We believe that our OS is lower than that described in the literature because most of studies include others LGG (oligodendroglioma/oligoastrocytoma) and probably because part of our sample has less than 48 months of follow-up.

Patients were submitted to more extensive resections when they presented compact and localized lesions in non-eloquent areas while tumors in eloquent area and multilobar in extension were only biopsied. However, when the OS of patients with lesions in non-eloquent and eloquent areas

submitted to GTR/STR was compared, no significant difference was observed, confirming that extension of resection impacted positively on survival time. Nevertheless, resection of eloquent area implies higher risk of neurologic deficits, and, therefore, quality of life in medium and long term of those patients should be evaluated for the final decision about these patients management. Moreover, recent intra-surgical devices to monitor the functional behavior of eloquent areas may allow maximize the extent of tumor resection with consequent improvement in survival time.

Additionally, the recent disclosure of biological markers for different brain tumor types may further allow refining the decision making on therapeutic handling of these patients²¹⁻²³.

In conclusion, improved outcome in adult patients with LGA is predicted by more aggressive surgery in both eloquent and non-eloquent brain areas.

References

1. Lang FF, Gilbert MR. Diffusely infiltrative low-grade gliomas in adults. *J Clin Oncol* 2006;24:1236-1245.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109.
3. Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States 1n 2004-2007. Available at: www.cbtrus.org/2011-NCPR-SEER-WEB-0407-Report-3-3-2011.pdf. Accessed Oct 29 2012.
4. Duffau H. Surgery of low-grade gliomas: towards a 'functional neurooncology'. *Curr Opin Oncol* 2009;21:543-549.
5. Janny P, Cure H, Mohr M, et al. Low grade supratentorial astrocytomas. Management and prognostic factors. *Cancer* 1994;73:1937-1945.
6. Keles GE, Lamborn KR, Berger MS. Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome. *J Neurosurg* 2001;95:735-745.
7. Kelly PJ. Gliomas: survival, origin and early detection. *Surg Neurol Int* 2010;1:96.
8. Leighton C, Fischer B, Bauman G, et al. Supratentorial low-grade glioma in adults: an analysis of prognostic factors and timing of radiation. *J Clin Oncol* 1997;15:1294-1301.
9. Piepmeyer J, Baehring JM. Surgical resection for patients with benign primary brain tumours and low grade gliomas. *J Neurooncol* 2004;69:55-65.
10. Low Grade Glioma Guidelines Team in association with the Guidelines and Outcomes Committee of the American Association of Neurological Surgeons. Practice parameters in adults with suspected or known supratentorial nonoptic pathway low-grade glioma. *Neurosurg Focus* 1998;4:10.
11. Schiff D, Brown PD, Giannini C. Outcome in adult low grade glioma: the impact of prognostic factors and treatment. *Neurology* 2007;69:1366-1373.
12. McGirth MJ, Chaichana KL, Attenello FJ, et al. Extent of surgical resection is independently associated with survival in patients with hemispheric infiltrating low-grade gliomas. *Neurosurgery* 2008;63:700-708.
13. McGirth MJ, Chaichana KL, Gathinji M, et al. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. *J Neurosurg* 2009;110:156-162.
14. Sanai N, Berger MS. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* 2008;62:753-764.
15. Smith JS, Chang EF, Lamborn KR, et al. Role of extent of resection in the long-term outcome of low-grade hemispheric gliomas. *J Clin Oncol* 2008;26:1338-1345.
16. Pouratian N, Asthagiri A, Jagannathan J, Shaffrey ME, Schiff D. Surgery insight: the role of surgery in the management of low-grade gliomas. *Nat Clin Pract Neurol* 2007;3:628-639.
17. Chang EF, Smith JS, Chang SM, et al. Preoperative prognostic classification system for hemispheric low-grade gliomas in adults. *J Neurosurg* 2008;109:817-824.
18. Chang EF, Clark A, Jensen RL, et al. Multiinstitutional validation of the University of California at San Francisco Low-Grade Glioma Prognostic Scoring System. *Clinical article. J Neurosurg* 2009;111:203-210.
19. Mariani L, Siegenthaler P, Guzman R, et al. The impact of tumour volume and surgery on the outcome of adults with supratentorial WHO grade II astrocytomas and oligoastrocytomas. *Acta Neurochir* 2004;146:441-448.
20. Schomas DA, Laack NN, Ra RD, et al. Intracranial low-grade gliomas in adults: 30-year experience with long-term follow-up at Mayo Clinic. *Neuro Oncol* 2009;11:437-445.
21. Bettgowda C, Agrawal N, Jiao Y, et al. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science* 2011;333:1453-1455.
22. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* 2011;333:425.
23. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321:1807-1812.