Roseli da Silva

**Expressão gênica da família das lisil
oxidases e papel funcional de *LOX* em
astrocitomas**

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

Programa de Neurologia

Orientadora: Dra. Sueli Mieko Oba-Shinjo

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Roseli da

Expressão gênica da família das lisil oxidases e papel funcional de *LOX* em
astrocitomas / Roseli da Silva. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Neurologia.

Orientadora: Sueli Mieko Oba-Shinjo.

Descritores: 1.Astrocitoma 2.Expressão gênica 3.Reação em cadeia da
polimerase em tempo real 4.Glioblastoma 5.Imuno-histoquímica
6.Prognóstico 7.Marcadores biológicos de tumor 8.Estudos de associação
genética 9.Glioma/genética 10.Linhagens celulares 11.Mutação 12.Migração

USP/FM/DBD-284/14

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas os homens compreendem, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

Galileu Galilei

Aos meus pais, Antonio José e Joana Neci,
que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram a
seus filhos a oportunidade de realizar sonhos e conquistas.

Ao meu irmão Rubens
pelo apoio, otimismo e, acima de tudo, a amizade

Agradecimentos

Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza chegará mais longe” (Érico Veríssimo). Uma tese de doutorado é o resultado de um conjunto de etapas que não se realizam isoladamente. Muitas coisas apreendi, muitos valores guardei e muitas vitórias conquistei. Tudo isso não seria possível sem a ajuda de pessoas que foram determinantes para essa evolução pessoal. Assim, rumo ao final desta história, dedico aqui algumas palavras àqueles que direta ou indiretamente dela fazem parte.

À minha orientadora e, principalmente, amiga Dra. Sueli Mieko Oba-Shinjo, que desde o mestrado me acompanha, me incentivando e me encorajando com seu exemplo a abraçar com todas as forças a árdua tarefa de orientar. Por ter abraçado a minha causa e apoiado as minhas escolhas, a ela, todo o mérito deste trabalho, e o meu “MUITO OBRIGADA” por ter me dado o privilégio de ter a sua presença em minha história!!!

À Profa. Dra. Suelly Kazue Nagahashi Marie, quero agradecer pela ajuda e pelas valiosas contribuições no desenvolvimento deste trabalho, agradeço ainda pela amizade, confiança e incentivo. Sou inteiramente grata por suas colaborações e pelas portas que me abriu desde o primeiro dia que entrei no laboratório. Minha admiração e muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Sérgio Rosemberg, por todo o seu auxílio como neuropatologista na leitura e classificação dos casos.

A todo o grupo da Divisão de Neurocirurgia, pelo encaminhamento dos casos que fizeram parte deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Neurologia, Thaís Figueira, Sra. Suelly, Sra. Reiko pelo apoio e realização deste trabalho.

Ao Dr. Hélio Rodrigues e ao Dr. José Antônio Livramento, chefes do Laboratório de investigação Médica LIM-15, onde este trabalho foi desenvolvido. Obrigada.

Ao Carlos Alberto, obrigada pelas conversas, pela atenção, pelos conselhos “infalíveis”, pelo elogio que só vem de quem realmente gosta e, principalmente, por te importares comigo.

À amiga Maria José Ferreira Alves, pelo carinho e incentivo, e sempre compartilhando de todos os momentos da minha vida. Praticamente estamos juntas nessa caminhada, desde a prova de inglês, até a entrada na pós-graduação. Obrigada por existir na minha vida !!!

À amiga Miyuki Uno, pela sua amizade e todo apoio. Pessoa igual à você não há, faça chuva ou faça sol, está sempre disposta a ajudar, muito obrigada por todos os ensinamentos!!!

Ao amigo e Professor Samuel K. Shinjo, um exemplo de docente, além de ser um grande médico, obrigada por toda ajuda tanto acadêmica quanto pessoal.

À amiga Célia Miyagui, pelo carinho, amizade e por todo apoio. Pode ter certeza que você faz toda diferença.

À Laís por todo seu carinho, apoio e amizade. Quantos cafés e pandoras fizeram parte dessa história, você é uma grande companheira.

À Fernanda Andrade e a sua mãe Nilva, por todo carinho e amizade.

À amiga Priscila Carvalho, que com seu jeitinho angelical sempre dando apoio e carinho.

À amiga Mussya Cisotto, que sempre esteve presente com a toda sua alegria e o companheirismo. Você é nota 10 !!!!

À companheira Simone Cavalheiro, pelo seu exemplo de luta e força e por deixar agarrar aqueles filhos lindos.

À Gisele Reis, que um dia reclamou que não havia agradecimento na dissertação de mestrado, agora posso agradecer-lá: Obrigada por toda sua amizade carinho e apoio, e por compartilhar de momentos tão engraçados, suas frases são contagiantes.

À minha querida Rosa, que sempre contagia a todos com seu lindo sorriso e seu jeito meigo de ser. Obrigada por todo seu carinho e amizade.

Às minhas queridas companheiras Márcia Azevedo e Maria Eunice que sempre me deram apoio e carinho.

À Thaís Fernanda Galatro e a Paula Sola, pelo carinho, amizade e pela realização da imuno-histoquímica. Muito obrigada.

Ao Dr. Carlos Clara, pela sua amizade e carinho, pelo seu exemplo de humildade.

Ao amigo Luiz Roberto, por todo apoio companheirismo e acima de tudo pela amizade. Você faz a diferença !!!

Ao Felipe amigo e companheiro de profissão por todos os momentos de descontração e apoio.

Às amigas Katia Carvalho e Zenaide por todo carinho e apoio.

Um agradecimento especial a todos os meus amigos que torceram pela minha vitória: Reginalda Lopes, Rita Nunes, Juliana Nascimento, Marilda Guimarães, Ernane Ferreira, Rafael, Osmar Jr, Sofia Santos, Juliana Kitahara, Tatiana Vainboim, Ester, D. Irene Viana, Nancy Huang, Adriana Lima, Cintia

Elim, Márcia Carvalho, Florence Dinutti, Nilde Hollfmann, Renata Correia, Paulo Barillari, Patrícia Takahashi, Mara Junqueira, Marcos Begnami.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório: Dr. Guilherme Lepski, Thaís Freire, Eliene Campos, Rodrigo Watanabe, Carlos Oshiro, Clarice, Isabele, Eric, Chary, Breno, Samya, Camila e Darcy Borges por todos os momentos alegres.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e a Fundação Faculdade de Medicina pelo suporte financeiro.

Aos pacientes e familiares que participaram deste trabalho, dedico este estudo, principalmente por depositarem em nós, médicos e pesquisadores, a confiança e a certeza de juntos conseguirmos encontrar soluções e uma melhor qualidade de vida.

À minha baixinha Sofia K. Shinjo, que sempre esteve presente na minha vida, sempre me descontraindo com a sua magia de ser criança.

Aos meus lindos afilhados Ivan, Pedro e Lucas que sempre me contagiam com todo o amor e carinho que sentem por mim, o sorriso de vocês me encanta!!!

Finalmente, gostaria de expressar a minha gratidão aos meus compadres e grandes amigos Iraní e Fabio Gerab, Isabel e Adalberto, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

À Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central	2
1.1.1. Gliomas	2
1.1.1.1. Astrocitoma pilocítico (grau I)	3
1.1.1.2. Astrocitoma difuso ou de baixo grau (grau II)	3
1.1.1.3. Astrocitoma anaplásico (grau III)	4
1.1.1.4. Glioblastoma (grau IV)	4
1.2. Família das lisil oxidases	5
1.2.1. Principal membro: LOX	5
1.2.2. Demais membros da família das lisil oxidases	8
1.2.3. LOX e Câncer	9
1.2.3.1 LOX como gene supressor de tumor	10
1.2.3.2 LOX como promotor de progressão tumoral	11
1.2.4. Família das lisil oxidases e câncer	16
1.2.4.1 Família das lisil oxidases como supressora de tumor	16
1.2.4.2 Família das lisil oxidases como promotora de progressão tumoral	18
1.2.5. Família das lisil oxidases como alvos terapêuticos	20
1.3 IDH1	24
1.3.1 Mutações de <i>IDH1</i>	24
1.4 Racional do projeto	25
2. OBJETIVOS	26
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	28
3.1. Casuística	29
3.2. Linhagens celulares	30
3.3. Análise da expressão gênica	30
3.3.1. Extração de RNA total	30
3.3.2. Síntese de cDNA por transcrição reversa	30
3.3.3. Desenho de <i>primers</i>	31
3.3.4. PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)	32
3.4. Extração de DNA e sequenciamento de <i>IDH1</i>	33
3.5. Ensaio Funcionais	34
3.5.1. Silenciamento gênico por RNA de interferência pequeno	34
3.5.2. Curva de proliferação	35
3.5.3. Ensaio de migração e invasão celular	35
3.5.4. Tratamento com BAPN (Beta-aminopropionitrile)	35

3.5.5. Crescimento em suspensão de agarose	36
3.6. Análise da expressão proteica	36
3.6.1. Western Blotting	36
3.6.2. Imuno-histoquímica	37
3.7. Análises estatísticas	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Análise de expressão gênica	41
41.1. Otimização das reações de PCR em tempo real	41
41.2. Análise de expressão gênica em astrocitomas	46
41.3. Correlações das expressões gênicas	51
4.2. Análise de sobrevivência	53
4.3. Associação entre a expressão gênica e o status de mutação de <i>IDH1</i>	55
4.4. Análise da expressão proteica	57
4.5. Ensaio funcional	63
4.5.1. Silenciamento do gene <i>LOX</i>	63
4.5.2. Efeito do silenciamento de <i>LOX</i> na proliferação celular	64
4.5.3. Efeito do silenciamento e inibição de <i>LOX</i> na migração celular	65
4.5.4. Efeito do silenciamento de <i>LOX</i> na invasão celular	65
4.5.5. Efeito do silenciamento de <i>LOX</i> no crescimento independente de ancoragem	67
5. DISCUSSÃO	69
5.1. Expressão gênica da família das lisil oxidases <i>BMP1</i> e <i>HIF1A</i> em astrocitomas	70
5.2. Correlação da expressão dos genes da família das lisil oxidases, <i>BMP1</i> e <i>HIF1A</i> com o status de mutação de <i>IDH1</i>	73
5.3. Expressão proteica dos membros da família das lisil oxidases em astrocitomas	74
5.4. Análise funcional de <i>LOX</i> em astrocitomas <i>in vitro</i>	76
6. CONCLUSÕES	79
7. ANEXOS	81
8. REFERÊNCIAS	94

Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGI	astrocitoma de baixo grau
AGII	astrocitoma grau II
AGIII	astrocitoma grau III
Akt	proteína quinase b
BAPN	beta-aminopropionitrile
BCL2	proteína linfoma de célula B 2
BMP1	proteína morfogenética óssea 1
Ca ²⁺	íon de cálcio
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CRL	domínio semelhante a receptor de citocina
Cu	cobre
DMEM	meio modificado de Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfatado
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
E2F1	fator de transcrição E2F
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
FAK	quinase de adesão focal
GBM	glioblastoma
GUSB	gene da glucuronidase beta
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de SP
HE	hematoxilina/eosina
HIF-1	fator induzido por hipóxia-1
HIF-1 α	fator induzido por hipóxia 1 α
<i>HPRT</i>	gene da hipoxantina fosforribosiltransferase
IDH1	isocitrato deidrogenase1
IDH2	isocitrato deidrogenase2
IFN- γ	interferon- γ
LOX-PP	Pro-preptídeo da lisil oxidase
LOX	lisil oxidase
LOXL1	proteína tipo-lisil oxidase 1
LOXL2	proteína tipo-lisil oxidase 2
LOXL3	proteína tipo-lisil oxidase 3
LOXL4	proteína tipo-lisil oxidase 4
LTQ	lisil-tirosil-quinona
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	matriz extracelular
MgCl ₂	cloreto de magnésio
NaCl	cloreto de sódio

NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
NH ₃	amônia
NF-κB	fator nuclear kappa B
NN	não neoplásico
NTC	<i>Non-Targeting Control</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGFRβ	receptor β do fator de crescimento derivado de plaqueta
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	potencial de hidrogênio
PI3K	fosfatidilinositol-3- quinase
PHD	prolil hidroxilase
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
STAT3	transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
Si	peptídeo sinal
SNC	sistema nervoso central
SRCR	<i>scavenger receptor cysteine-rich</i>
TBP	proteína de ligação a TATA
TGF-β	fator de crescimento transformador β
TE	tris-EDTA
TEM	transição epitelial mesenquimal
TLL1	<i>Tolloid-like 1</i>
TLL2	<i>Tolloid-like2</i>
TNF-α	fator de necrose tumoral α
UV	ultravioleta
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
α-KG	α-cetoglutarato
2HG	2-hidroxiglutarato

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição do envolvimento dos genes da família das lisil oxidases em diversos tipos de câncer	17
Tabela 2: Sequência de nucleotídeos de <i>primers</i> para a reação de PCR em tempo real e tamanho dos produtos de PCR	32
Tabela 3: Especificações de anticorpos primários utilizados para imunohistoquímica	38
Tabela 4: Concentrações de <i>primers</i> para a reação de PCR em tempo real e eficiências de amplificação	44
Tabela 5: Valores das expressões absolutas dos genes analisados por PCR em tempo real.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Processo de síntese e maturação de LOX	6
Figura 2:	Organização genômica e proteica da família das lisil oxidases...	9
Figura 3:	Modelo da atividade LOX como promotora da progressão tumoral em câncer de mama	13
Figura 4:	Papel de LOX em várias vias de sinalização em câncer	15
Figura 5:	Papel dos membros da família das lisil oxidases na progressão tumoral.....	20
Figura 6:	Curvas de amplificação e curvas padrões para determinação das eficiências de amplificação de PCR em tempo real dos genes <i>LOX</i> , <i>LOXL1</i> , <i>LOXL2</i> e <i>LOXL3</i>	42
Figura 7:	Determinação das eficiências de amplificação de PCR em tempo real dos genes <i>LOXL4</i> , <i>BMP1</i> e <i>HIF1A</i>	43
Figura 8:	Curvas de dissociações dos produtos de PCR em tempo real dos genes <i>LOX</i> , <i>LOXL1</i> , <i>LOXL2</i> , <i>LOXL3</i> , <i>LOXL4</i> , <i>BMP1</i> e <i>HIF1A</i> ..	45
Figura 9:	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR em tempo real de <i>LOX</i> , <i>LOXL1</i> , <i>LOXL2</i> , <i>LOXL3</i> , <i>LOXL4</i> , <i>BMP1</i> , <i>HIF1A</i> , <i>GUSB</i> , <i>HPRT</i> e <i>TBP</i>	46
Figura 10:	Expressão de <i>LOX</i> em tecidos cerebrais não tumorais e em astrocitomas de diferentes graus de malignidade	47
Figura 11:	Expressão de <i>LOXL1</i> , <i>LOXL2</i> e <i>LOXL3</i> em tecidos cerebrais não tumorais e em astrocitomas de diferentes graus de malignidade	48
Figura 12:	Expressão de <i>LOXL4</i> , <i>BMP1</i> e <i>HIF1A</i> em tecidos cerebrais tumorais e em astrocitomas de diferentes graus de malignidade	49
Figura 13:	Mapa de cores dos dados de correlações de Spearman rho dos valores de expressão dos genes <i>LOX</i> , <i>LOXL1</i> , <i>LOXL2</i> , <i>LOXL3</i> , <i>LOXL4</i> , <i>BMP1</i> e <i>HIF1A</i>	52
Figura 14:	Curvas de sobrevida comparando pacientes com GBM com hiperexpressão (verde) e hipoexpressão (azul) dos genes <i>LOX</i> , <i>LOXL1</i> , <i>LOXL2</i> , <i>LOXL4</i> , <i>HIF1A</i> e <i>BMP1</i>	54
Figura 15:	Curva de sobrevida comparando-se pacientes com GBM com hiper (verde) e hipoexpressão (azul) de <i>LOXL3</i>	55

Figura 16: Comparação dos níveis de expressão dos genes entre os casos com e sem mutação de <i>IDH1</i> nos astrocitomas difusamente infiltrativos.....	56
Figura 17: Análise da imunomarcção de LOX em astrocitomas e tecidos cerebrais não-neoplásicos.....	58
Figura 18: Análise da imunomarcção de LOXL1 em astrocitomas e tecidos cerebrais não-neoplásicos.....	59
Figura 19: Análise da imunomarcção de LOXL2 em astrocitomas e tecidos cerebrais não-neoplásicos.....	60
Figura 20: Análise da imunomarcção de LOXL3 em astrocitomas e tecidos cerebrais não-neoplásicos.....	61
Figura 21: Análise da imunomarcção de LOXL4 em astrocitomas e tecidos cerebrais não-neoplásicos.....	62
Figura 22: Expressão de LOX em células U87MG e A172 após silenciamento com siRNA.....	63
Figura 23: Efeito do silenciamento da expressão de <i>LOX</i> na proliferação celular nas células U87MG (A) e A172 (B)	64
Figura 24: Avaliação do comportamento migratório das células U87MG (A) e A172 (B) sem tratamento (parental), após transfecção com siRNA específico para <i>LOX</i> (siRNA <i>LOX</i>) ou controle (NTC) e tratadas com inibidor de LOX BAPN	66
Figura 25: Avaliação do comportamento invasivo das células U87MG (A) e A172 (B) após silenciamento da expressão <i>LOX</i> com siRNA em relação ao controle NTC	67
Figura 26: Avaliação do crescimento independente de ancoragem das células U87MG (A) e A172 (B) após silenciamento da expressão <i>LOX</i> com siRNA em relação ao controle NTC.....	68

RESUMO

Silva, R. Expressão gênica da família das lisil oxidases e papel funcional de *LOX* em astrocitomas [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O desenvolvimento e invasão de tumores cerebrais primários são diretamente influenciados pela matriz extracelular. Considerando que lisil oxidase (*LOX*) e os demais membros da família das lisil oxidases (*LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* e *LOXL4*) apresentam complexidade tanto estrutural quanto funcional e estão envolvidos em processos biológicos vitais, como motilidade celular, sinalização celular e regulação gênica, a desregulação da expressão destas proteínas pode levar à gênese e progressão tumoral. O presente trabalho teve como objetivos avaliar os níveis de expressão dos genes que codificam todos os membros da família das lisil oxidases em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e correlacionar com a expressão de *BMP1* e *HIF1A*, mutação de *IDH1* e tempo de sobrevida total dos pacientes. Adicionalmente, as expressões das proteínas codificadas por estes genes foram também realizadas, além de um estudo funcional *in vitro* do papel de *LOX* em astrocitomas. A análise da expressão dos genes foi realizada por PCR quantitativa em tempo real numa série de 153 astrocitomas e 22 amostras de tecido cerebral não neoplásico. A expressão proteica foi conduzida por imuno-histoquímica em amostras de astrocitomas. O silenciamento da expressão de *LOX* foi realizado em linhagens celulares de glioblastoma humano U87MG e A172 transfectadas com o siRNA para os ensaios funcionais. A expressão de todos os genes (*LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3*, *LOXL4*, *BMP1* e *HIF1A*) aumentou com o grau de malignidade dos astrocitomas, com maiores níveis nos casos de glioblastoma. Foi encontrada uma correlação positiva nos valores de expressão dos genes principalmente nos glioblastomas. Somente a expressão de *LOXL3* teve um impacto na sobrevida dos casos com GBM. Pacientes com maior expressão apresentaram maior sobrevida em relação aos com menor expressão de *LOXL3*. Os casos de astrocitoma grau II com mutação de *IDH1* apresentaram menor expressão de *LOXL1* e de *LOXL4* quando comparados com os casos sem mutação. Os casos de GBM com mutação de *IDH1*, por sua vez, apresentaram menores níveis de expressão de *LOX* e de *LOXL1* do que os casos sem *IDH1* mutado. Os níveis de expressão das proteínas da família das lisil oxidases também estavam maiores nas amostras de glioblastoma, com localização nuclear e citoplasmática das células, além de marcação do endotélio. Interessantemente, um caso de glioblastoma com mutação de *IDH1* apresentou menor expressão de *LOX*, inclusive nas células endoteliais. Nas análises funcionais, o silenciamento de *LOX* por siRNA e o tratamento com o inibidor BAPN das linhagens celulares U87MG e A172 afetaram a capacidade de migração. Além disso, a menor expressão de *LOX* afetou a capacidade de invasão e crescimento independente de ancoragem das células. Em conjunto, esses resultados corroboram o papel de *LOX* em processos importantes da tumorigênese dos astrocitomas. Adicionalmente, a expressão de *LOX* é influenciada pelo status de mutação de *IDH1*. Portanto, este trabalho fornece novas informações para as possíveis intervenções terapêuticas para o tratamento dos pacientes com astrocitomas.

Descritores: Astrocitoma; Expressão Gênica; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Glioblastoma; Imuno-histoquímica; Prognóstico; Marcadores biológicos de tumor; Estudos de associação genética; Glioma/genética; Linhagens celulares; Mutação; Migração.

ABSTRACT

Silva, R. Gene expression of lysyl oxidase family and functional role of *LOX* in astrocytomas [thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2014.

The development and invasion of primary brain tumors are directly influenced by the extracellular matrix. Considering that lysyl oxidase (LOX) and other lysyl oxidase family members (LOXL1, LOXL2, LOXL3 e LOXL4) have both structural and functional complexity and that they are involved in vital biological processes such as cell motility, cell signaling and gene regulation, a deregulation of these proteins can lead to the genesis and tumor progression. This study aimed to evaluate the expression levels of genes that code for the lysyl oxidase family members in astrocytomas of different malignant grades and to correlate to the expression of *BMP1* and *HIF1A*, *IDH1* mutation and overall patients' survival. Moreover, protein expression coded by these genes was also analyzed, besides an *in vitro* functional study of LOX role in astrocytomas. Gene expression analysis was performed by quantitative real-time PCR in a series of 153 astrocytomas and 22 samples of non-neoplastic brain. Protein expression was analyzed by immunohistochemistry in astrocytoma samples. *LOX* knockdown was performed in cells of human glioblastoma U87MG and A172 transfected with siRNA. Expression levels of all genes (*LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3*, *LOXL4*, *BMP1* e *HIF1A*) increased with the malignant grade of astrocytomas, glioblastomas presenting the higher levels. Positive correlations of gene expression values were observed specially in glioblastomas. Only *LOXL3* expression impacted in the overall survival of glioblastoma cases. Patients with higher expression presented longer survival time than those with lower *LOXL3* expression. Astrocytoma grade II cases with *IDH1* mutation presented lower *LOXL1* and *LOXL4* expression when compared to those cases with wild type *IDH1*. On the other hand, GBM cases with *IDH1*-mutated presented lower *LOX* and *LOXL1* expression than GBM cases without *IDH1* mutation. Protein expression levels of lysyl oxidase family members were also higher in glioblastoma samples, with both nuclear and cytoplasmic localization, and also endothelium staining. Interestingly, a glioblastoma case with *IDH1*-mutated had lower *LOX* expression, including endothelial cells. For functional analysis, *LOX* knockdown by siRNA and treatment with inhibitor BAPN of U87MG and A172 cell lines affected migration behavior. Furthermore, lower *LOX* expression affected invasion capacity and anchorage independent growth. Altogether, these results corroborate *LOX* role in important processes of astrocytoma tumorigenesis. Additionally, *LOX* expression is influenced by *IDH1* mutational status in glioblastomas. Therefore, our work provides new insights for possible therapeutic interventions for patients with astrocytomas.

Descriptors: Astrocytoma; Gene expression; Real-time polymerase chain reaction; Glioblastoma; Immunohistochemistry; Prognosis; Tumor markers, biological; Genetic association studies; Glioma/genetics; Cell lines; mutation; Migration.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são considerados raros. De acordo com estudos epidemiológicos, a incidência mundial de tumores cerebrais primários é de cerca de 7 indivíduos a cada 100.000 habitantes por ano, representando aproximadamente 2% do total dos tumores primários (Furnari et al., 2007). A classificação destes tumores baseia-se na semelhança histológica da célula tumoral com sua contraparte normal, seja ela, embrionária, fetal ou adulta. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece em sua classificação oficial mais de 120 formas de tumores do SNC (Louis et al., 2007). Entre estes, os mais comuns são os meningiomas e os gliomas, que juntos, representam 62% de um total de aproximadamente 227.000 tumores primários reportados no período de 2004 a 2007 pelo Centro de Registros de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (Dolecek et al., 2012). A distribuição dos tumores do SNC na população varia muito conforme a idade. Entre adultos, os mais comuns são os astrocitomas difusos, oligodendrogliomas e meningiomas. Já entre as crianças, há predomínio dos astrocitomas pilocíticos, ependimomas e meduloblastomas (Collins, 2004).

1.1.1. Gliomas

Os gliomas são os tumores do SNC mais frequentes derivados das células gliais, nas quais estão incluídos os astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas e ependimomas. Os astrocitomas são os mais prevalentes, perfazendo aproximadamente 60% dos tumores primários do SNC (Louis et al., 2007; Chen et al., 2012).

Segundo a OMS, os astrocitomas são classificados de acordo com a presença de indicadores morfológicos: atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e necrose (Louis et al., 2007). Desta forma, a graduação de malignidade tumoral é determinada pela presença do número de indicadores, sendo que o astrocitoma grau I não apresenta nenhum dos indicadores; o grau II apresenta um indicador de malignidade, geralmente atipia nuclear; o grau III

apresenta dois indicadores, geralmente atipia nuclear e mitoses; e o grau IV ou glioblastoma (GBM) apresenta três ou quatro indicadores, atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e/ou necrose. Adicionalmente, os astrocitomas do grau II a IV são denominados astrocitomas difusamente infiltrativos, pela característica de invadir o tecido cerebral normal circunjacente (Louis et al., 2007).

1.1.1.1. Astrocitoma pilocítico (grau I)

Os astrocitomas pilocíticos são, em geral, circunscritos, de crescimento lento e mais frequente em crianças e adultos jovens (Louis et al., 2007; Reifenberger & Collins, 2004). A maioria desses tumores (85%) desenvolve-se no cerebelo (Louis et al., 2007; Reifenberger & Collins, 2004). Outras regiões típicas (10%) incluem estruturas como o nervo e quiasma ótico, hipotálamo, tálamo, núcleo da base e tronco cerebral. Entretanto, os astrocitomas pilocíticos também podem ser encontrados nos hemisférios cerebrais ou na medula espinhal. Macroscopicamente essas neoplasias apresentam-se como maleáveis, acinzentadas e, frequentemente, com lesões císticas (Reifenberger & Collins, 2004). Histologicamente são caracterizados por baixa ou moderada celularidade, padrão bifásico com proporção variada de células bipolares compactadas com presença de fibras de Rosenthal e células soltas de estruturas multipolares com microcistos e corpos granulares (Louis et al., 2007). Dessa forma, segundo a OMS, os astrocitomas pilocíticos possuem bom prognóstico após ressecção cirúrgica (Louis et al., 2007).

1.1.1.2. Astrocitoma difuso ou de baixo grau (grau II)

Os astrocitomas de baixo grau ocorrem predominantemente no gênero masculino e afetam frequentemente adultos jovens, com um pico na terceira década de vida, entre 30 e 40 anos (Louis et al., 2007). Esses tumores representam de 10 a 15% de todos os tumores astrocíticos e podem estar localizados em qualquer região do SNC, preferencialmente nos hemisférios cerebrais, com infiltração difusa de estruturas adjacentes ao tumor (Louis et al., 2007). Após intervenção cirúrgica, a média de sobrevida é de cerca de 6 a 8

anos, embora haja uma variação individual, com alguns casos permanecendo latentes por vários anos e outros progredindo rapidamente para astrocitomas de maior grau de malignidade (Johnson & O'Neill, 2012). Na recidiva tumoral de astrocitoma grau II, a segunda amostra cirúrgica frequentemente mostra características de astrocitoma anaplásico, como hipercromasia, aumento de atipia nuclear, atividade mitótica e, eventualmente, características de GBM, como proliferação microvascular e/ou necrose. A progressão para a anaplasia é imprevisível, bem como o tempo que estas mudanças levam para ocorrer (Louis et al., 2007).

1.1.1.3. Astrocitoma anaplásico (grau III)

Os astrocitomas anaplásicos acometem preferencialmente homens adultos com média de idade 41 anos. São tumores infiltrativos com anaplasia focal ou dispersa e um grande potencial proliferativo. Sua localização é semelhante a dos astrocitomas de baixo grau, com preferência pelos hemisférios cerebrais (Louis et al., 2007).

Estes tumores se originam da progressão de um astrocitoma de baixo grau e, em um intervalo médio de 2 anos, possuem uma tendência intrínseca de progredirem para GBM (Furnari et al., 2007). Assim, do ponto de vista clínico, morfológico e genético, pode-se considerar que o astrocitoma anaplásico constitui um estágio intermediário na rota de progressão para um GBM.

1.1.1.4. Glioblastoma (grau IV)

Os GBMs são os mais malignos dos tumores astrocíticos perfazendo cerca de 50% dos mesmos, e de 20 a 25% do total das neoplasias intracranianas, tornando-os os mais frequentes do SNC (Surawicz et al., 1999; Furnari et al., 2007). GBMs ocorrem mais frequentemente na substância branca dos hemisférios cerebrais e podem se manifestar em qualquer idade, mas afetam preferencialmente homens adultos entre 45 e 70 anos de idade (Louis et al., 2007). Podem ser classificados em primários e secundários. Os primários são mais frequentes em pessoas com média de idade de 55 anos e se manifestam *de novo*, ou seja, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica

da existência de uma lesão menos maligna anterior após uma história clínica muito curta, normalmente menos de três meses. Este tipo de GBM parece ser resistente à radioterapia, com lesões altamente infiltrativas e, deste modo, apresentam um pior prognóstico (Ohgaki & Kleihues, 2013). Os secundários se desenvolvem tipicamente em indivíduos com média de idade de 45 anos, através da progressão de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico. O tempo de evolução varia consideravelmente, com intervalos entre 1 ano ou mais de 10 anos. Os GBMs secundários ocorrem em indivíduos com história clínica e biópsias sequenciais de astrocitomas de menor grau (Ohgaki & Kleihues 2013).

1.2. Família das lisil oxidases

1.2.1. Principal membro: LOX

A lisil oxidase (LOX) é uma enzima que possui a função de promover a formação de ligações cruzadas de colágeno e elastina na matriz extracelular (MEC), mantendo assim, sua integridade.

O gene que codifica a enzima, *LOX*, localizado no cromossomo 5, porção 5q23.2, possui 7 exons e codifica uma proteína imatura de 417 aminoácidos (Hamalainen et al., 1991 e 1993; Mariani et al., 1992). A porção 3' terminal apresenta tanto o sinal canônico de poliadenilação quanto o não canônico, o que explica a diferença de tamanho encontrada entre os transcritos alternativos (Csiszar et al., 1996). Esse diferencial de sítios alternativos de poliadenilação tem sido observado em membranas fetais e adultas (Hamalainen et al., 1991; Csiszar, 2001).

A proteína LOX é sintetizada como uma pré-proteína, ou PreproLOX, de 48kDa, na qual incluem-se 21 aminoácidos da porção N-terminal (Trackman et al., 1992; Lucero & Kagan, 2006). A PreproLOX é N-glicosilada e secretada como uma proenzima (proLOX), que apresenta 50kDa. Uma vez secretada, a proLOX é clivada principalmente pela enzima BMP1 (*bone morphogenetic protein 1*) e, em menor grau, pelas enzimas TLL1 e TLL2 (*tolloid-like 1 e 2*). A clivagem ocorre entre os aminoácidos 168 e 169, resultando em duas porções,

a da enzima propriamente dita de 32kDa, denominada LOX, e outra de 18kDa denominada propeptídeo (LOX-PP) (Panchenko et al., 1996; Uzel et al., 2001). Os processos de síntese e maturação estão representados na Figura 1.

Figura 1: Processo de síntese e maturação de LOX. Uma vez traduzida, a proteína passa por diversas modificações no retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi. Quando secretada, é clivada por enzimas específicas, sendo BMP1 a mais importante, dando origem a um propeptídeo (LOX-PP), de 18kDa, e à enzima propriamente dita LOX, de 32kDa, com atividade catalítica em resíduos de lisina de fibras do colágeno e elastina (Bertoldi, 2012).

A atividade enzimática de LOX se dá no meio extracelular, onde estão presentes as fibras de colágeno e elastina, mais especificamente nos resíduos de lisina. Na presença de água e oxigênio, LOX transforma a lisina em alisina, via oxidação da porção amina na extremidade R do aminoácido, gerando como subprodutos amônia (NH₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A alisina passa a apresentar um átomo de oxigênio ligado à cadeia R por ligação covalente dupla. Esta ligação torna esta extremidade um semialdeído, fazendo da alisina um peptil-aldeído. A reação pode ser representada por $RCH_2NH_2 + H_2O + O_2 \rightarrow RCHO + NH_3 + H_2O_2$ (Kagan & Li, 2003). A lisina com o grupo amina na extremidade R não se liga a outros aminoácidos, mantendo as macromoléculas em estado solúvel. Uma vez oxidada e convertida a alisina, passa a ter

capacidade de se ligar a grupos amina ou a outros peptil-aldeídos e gerar a ligação cruzada covalente observada entre fibras de colágeno ou elastina na MEC (Smith-Mungo & Kagan, 1998). LOX também exerce atividade catalítica nos resíduos de hidroxilisina, convertendo-a em hidroxialisina em processo similar e de igual resultado (Kagan & Li, 2003).

LOX pode ser inibido por uma droga denominada β -aminopropionitrile (BAPN), um potente e irreversível inibidor (Tang et al., 1983). BAPN é um composto latirógeno, ou seja, possui capacidade de inibir a formação de ligações cruzadas de colágeno. Seu efeito *in vivo* foi reconhecido antes da identificação da atividade de LOX *in vitro*. A administração de BAPN em camundongos em crescimento resulta em latirismo, com um aumento da fragilidade de todos os tecidos conjuntivos e uma elevação concomitante na solubilidade do colágeno (Levene et al., 1959; Gross et al., 1960). Camundongos LOX ^{-/-} morrem prematuramente no final da gestação devido a aneurisma de aorta e disfunção cardiovascular (Mäki et al., 2002), além de ocorrer também uma diminuição da diferenciação osteoblástica (Pischon et al., 2009). BAPN foi capaz de prevenir ou retardar a diferenciação de condrócitos (Farjanel et. al.; 2005).

A baixa expressão ou função catalítica reduzida de LOX levam às doenças relacionadas ao tecido conjuntivo, como *cutis laxa*, síndrome de Menkes e certas disfunções espontâneas coronarianas. De forma inversa, o aumento da expressão ou função de LOX leva a doenças fibróticas, como arteriosclerose e cirrose hepática (Payne et al., 2007; Rodriguez et al., 2008). A expressão de LOX também pode ser regulada pelo fator de crescimento transformador β (TGF- β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) em fibrose cardíaca (Voloshenyuk et al., 2011a; Voloshenyuk et al., 2011b).

Embora LOX seja secretada pelas células e processada na MEC, parte é translocada para o núcleo, onde afeta a expressão gênica e o ciclo celular (Nellaiappan et al., 2000; Kagan et al., 2003). Esse controle de LOX mediada as atividades intracelulares pode ser devida à oxidação de lisina de proteínas nucleares, tal como histona H1, que pode ser oxidada dentro do núcleo de células de músculo liso vascular (Kagan et al., 2003). Esta oxidação de lisina da histona H1 pode ter um efeito epigenético nas interações DNA-histona e histona-histona, semelhante ao da acetilação de histona (El-Osta & Wolffe, 2000).

1.2.2. Demais membros da família das lisil oxidases

Além de LOX, outros quatro membros compõem a família das lisil oxidases, as denominadas proteínas tipo-LOX 1, 2, 3 e 4 (LOXL1, LOXL2, LOXL3 e LOXL4) (Payne et al., 2007). Os membros são altamente conservados nos domínios catalíticos maduros das porções C-terminal (Figura 2). Entretanto, diferem significativamente nas suas extremidades N-terminal onde se localizam os pro-peptídeos: o de LOXL1 possui um domínio rico em prolina, enquanto que os de LOXL2, LOXL3 e LOXL4 apresentam cada um quatro domínios SRCR (*scavenger receptor cysteine-rich*) (Payne et al., 2007; Lucero & Kagan, 2006). Estes tipos de domínios, encontrados frequentemente nas proteínas de superfície celular associadas com o sistema imune, podem estar envolvidos na interação proteína-proteína (Lucero & Kagan, 2006). Baseado nas similaridades estruturais dos seus domínios, LOX e LOXL1 formam uma subfamília, enquanto que LOXL2, LOXL3 e LOXL4 formam outra subfamília (Figura 2).

LOXL1, semelhantemente a LOX, é secretado como proproteína (proLOXL1) e clivado proteoliticamente para liberar o domínio catalítico. Entretanto não se sabe ainda se o mesmo processo ocorre com LOXL2, LOXL3 e LOXL4 (Lucero & Kagan, 2006).

Especula-se que os membros da família das lisil oxidases possuem a mesma ação de LOX na estabilização da MEC, principalmente devido à alta homologia dos seus domínios catalíticos (Kagan et al., 2003; Molnar et al., 2003).

LOXL2 possui ação sobre fibras de colágeno e elastina (Kim et al., 2011) e promove a diferenciação dos condrócitos e maturação da MEC da cartilagem (Iftikhar et al., 2011).

Localização cromossômica	Domínio da proteína	Sequência codificadora da proteína	Referências
LOX: 5q23.3-31.2, 7 exons – 15 Kb		417 aminoácidos, proenzima, 50 kDa enzima ativa 32 kDa polipeptídeo	Hamalaian et al., 1991; 1993; Mariani et al., 1992
LOX1: 15q22, 7 exons -25Kb		574 aminoácidos, 63 kDa polipeptídeo	Kim et al., 1995; Szabó et al., 1997; Borel et al., 2001
LOXL2 :8p21.2-21.3 – 11 exons		774 aminoácidos, 87 kDa polipeptídeo	Murano et al., 1991. Saito et al., 1997; Saux et al., 1998; Jourdan-Le 1999; Vadasz et al., 2005
LOXL3 :2p13.3, 14 exons- 21 Kb		753 aminoácidos, 80 kDa polipeptídeo	Jourdan-Le Saux et al., 2001; Maki and Kivirikko, 2001; Huang et al., 2001; Lee and Youngho, 2006.
LOXL4 :10q24, 14 exons		392 aminoácidos, 44kDa 756 aminoácidos, 82 kDa polipeptídeo	Asuncion et al., 2001; Maki et al., 2001; Kim et al, 2003

Figura 2: Organização genômica e proteica da família das lisil oxidases. Si: peptídeo sinal, Cu: domínio de ligação ao cobre, LTQ: sítio de ligação a cofatores LTQ (lisil-tirosil-quinona); CRL: domínio semelhante a receptor de citocina, SRCR: domínio de receptor *scavenger* rico em cisteína. Adaptado de Payne et al. (2007).

LOXL3 é o membro menos estudado desta família. Possui ação sobre colágeno e elastina, além de ser inibido por BAPN (Lee & Kim, 2006). Além disto, um aumento de expressão de LOXL3 foi relacionado com o enrijecimento ventricular e ação de linfócitos T no remodelamento cardíaco (Yu et al., 2006).

LOXL4 foi inicialmente descrito essencial na maturação da cartilagem e na deposição da MEC de cartilagem (Ito et al., 2001). A indução por (TFG β) contribui com processos vasculares associados a remodelamento e fibrose da MEC (Busnadiego et al., 2013).

1.2.3. LOX e câncer

Nosso grupo realizou estudos de *microarray* de oligonucleotídeos comparando os perfis de expressão gênica de amostras de GBMs e astrocitomas pilocíticos, com o intuito de identificar genes relacionados ao aumento da malignidade e invasibilidade em astrocitomas (Marie et al., 2008). Foram encontrados 63 genes cujas expressões nos casos de GBMs estavam aumentadas em pelo menos duas vezes em comparação com os de astrocitomas pilocíticos. Mais da metade estavam relacionados com proliferação

celular, agiam diretamente no ciclo celular ou estavam envolvidos na regulação ou no arranjo de eventos mitóticos. Entre os genes relacionados ao metabolismo de proteínas encontrava-se o *LOX*, com um aumento de expressão em GBMs de 11 vezes em relação às amostras de astrocitomas pilocíticos.

Considerando que *LOX* apresenta complexidade tanto estrutural quanto funcional e seu envolvimento em processos biológicos vitais, como motilidade celular, sinalização celular e regulação gênica, fica evidente que a desregulação desta proteína pode levar à gênese e progressão tumoral. Estas diversas funções têm levado à formulação da hipótese de que *LOX* pode ter várias funções que afetam tanto a função intracelular, quanto a extracelular da célula.

Tanto a alta quanto a baixa regulação de *LOX* em tecidos tumorais e linhagens de células tumorais tem sido descrito, sugerindo um papel para *LOX* tanto de gene supressor de tumor, como de promotor de progressão tumoral, como apresentado na Tabela 1.

1.2.3.1. *LOX* como gene supressor de tumor

O primeiro papel no câncer atribuído a *LOX* foi de gene supressor tumoral. *LOX* foi capaz de inibir a capacidade de transformação maligna de linhagem de fibroblastos murinos pelo gene *ras* (Contente et al., 1990; Kenyon et al., 1991). Esta função de supressão tumoral foi atribuída tanto ao *LOX-PP* de 18kDa (Zhao et al., 2009 a), quanto à *proLOX* de 50kDa (Contente et al., 2009).

A expressão ectópica de *LOX-PP* foi capaz de inibir o fenótipo transformado de células de câncer de mama, pâncreas, pulmão e próstata *in vitro* (Min et al., 2007; Wu et al., 2007b; Palamakumbura et. al., 2009; Sanchez-Morgan et al., 2011). *LOX-PP* inibe a ativação do fator nuclear kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) e reprime a transcrição do oncogene *BCL2* (linfoma de célula B2) (Wu et al., 2007b). Além disto, *LOX-PP* também é capaz de inibir o crescimento de tumores de mama *in vivo* através da inibição da sinalização via receptor Her-2/*ras* (Sato et al., 2011; Bais et al., 2012). *LOX-PP* atua como supressor tumoral via interação com a Hsp70 e c-Raf, inibindo a via de sinalização MEC induzida por *ras* (Sato et al., 2011). Recentemente foi demonstrado que o *LOX-PP* apresenta propriedade antiproliferativa em células de sarcoma de Ewing e carcinoma hepatocelular *in*

vitro e *in vivo*, através da inibição da via de sinalização proteína quinase ativada por mitógeno / quinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK) (Agra et al.; 2013; Zheng et al., 2014).

A proteína recombinante LOX-PP foi capaz de inibir o crescimento de tumor de próstata *in vivo* sensibilizando as células tumorais a efeito de radiação através da interação direta com proteínas de reparo de DNA, sugerindo um importante potencial terapêutico (Bais et al., 2012) para câncer de pulmão.

Além disto, a baixa expressão de *LOX* já tem sido descrita em diversos tumores (Tabela 1) e o mecanismo como ocorre ainda é pouco conhecido. Em câncer gástrico, *LOX* é inativado por metilação e perda de heterozigotidade (Kaneda et al., 2004).

1.2.3.2. LOX como promotor de progressão tumoral

Os primeiros estudos que apontaram *LOX* como promotor da progressão tumoral foram realizados em células de câncer de mama, que mostraram maior expressão nas células invasivas do que nas não invasivas (Kirschmann et al., 1999, Kirschmann et al., 2002). A inibição de *LOX* a nível transcricional e proteico, através de oligonucleotídeos antisense e inibidor BAPN, demonstrou o envolvimento de *LOX* na regulação da migração celular através de um mecanismo dependente de peróxido hidrogênio (Payne et al., 2005).

Em células de câncer de mama, a expressão exógena de *LOX* facilitou a ativação de Src e quinase de adesão focal (FAK), atuando sobre Rho e interferindo na formação de fibras de actina, estabelecendo-se, assim, a relação entre *LOX* e a família Rho de GTPases (Rho, Rac e Cdc42). Estas proteínas regulam a polimerização das fibras de actina e a migração celular. A atividade de Rho leva à formação de fibras de *stress* de actina, relacionadas a um fenótipo não migratório. Por outro lado, a atividade de Rac e Cdc42 está associada à formação de lamelipódia e filopódia, respectivamente, e corresponde a um fenótipo migratório. Os experimentos realizados demonstraram que o H₂O₂ gerado pela atividade de *LOX* inibe Rho e estimula a atividade de Rac e Cdc42 e, conseqüentemente, induz o comportamento migratório da célula. O mecanismo pela qual *LOX* atua na via FAK/Src se dá através do complexo de

sinalização p130Cas/Crk/DOCK180. De maneira geral, o H_2O_2 estimula Src, que fosforila p130Cas e este, uma vez fosforilado, se liga a Crk. A ligação entre p130Cas e Crk leva ao recrutamento do DOCK180, que tem capacidade de fosforilar Rac. Assim, o complexo p130Cas/Crk/DOCK180 ativa Rac ao convertê-la de Rac-GDP a Rac-GTP, causando aumento na formação de lamelipodia. O resultado deste processo é a modificação da polimerização das fibras de actina e o fenótipo migratório da célula tumoral. Ressalta-se que diversas vias de sinalização intracelular regulam os membros da família Rho de GTPases. O mecanismo de ação de LOX procede pela interação com esta família de GTPases com consequente regulação da motilidade celular em geral (Figura 3) (Li et al., 2000; Payne et al., 2005; Payne et al., 2006).

Este mesmo mecanismo de sinalização de LOX para aumento da capacidade de migração e invasão de células de astrocitomas (Laczko et al., 2007), de câncer colorretal (Baker et al., 2013) e de ovário (Ji et al., 2013).

A hipóxia, uma característica de vários tipos de tumores, é um importante regulador da expressão de LOX. Além disto, LOX também regula positivamente a expressão do fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) em um mecanismo sinérgico para adaptação do tumor à hipóxia (Pez et al., 2011). As células de câncer estão mais bem adaptadas a sobreviver em condições de baixos níveis de oxigênio do que células normais (Cassavaugh & Lounsbury, 2011). A hipóxia estimula as proteínas HIF-1, que ativa a transcrição de genes envolvidos nos aspectos cruciais da biologia da célula, regulando diversos processos celulares, incluindo metabolismo, angiogênese, proliferação celular, apoptose e remodelamento celular. HIF-1 é composto por duas subunidades: α e β . A subunidade β é constitutivamente expressa e está presente em todas as condições de oxigênio e a subunidade α determina a atividade de HIF-1 que é regulada pela tensão de oxigênio (Semenza, 2003).

Figura 3: Modelo da atividade LOX como promotora da progressão tumoral em câncer de mama. LOX é secretada como uma proenzima inativa de 50kDa para a MEC (matriz extracelular), onde é clivada pela proteína morfogenética óssea-1 (BMP-1) para se tornar uma enzima cataliticamente ativa de 32kDa (LOX32). Posteriormente, LOX ativa pode translocar-se para dentro da célula ou permanecer na MEC. A interação catalítica subsequente com o substrato produz peróxido de hidrogênio, levando à estimulação da ativação de Src. Src ativado ativa, então, FAK (levando a alterações na adesão célula-matriz) e/ou ativa a via de sinalização p130^{Cas}/Crk/DOCK180 (facilitando a formação de filamentos de actina). A ativação de Src pode também levar à ativação do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) e do fator nuclear kappa B (NF-κB). Juntos, a estimulação dessas vias por LOX leva a motilidade celular e progressão do tumor. Figura adaptada de Payne et al (2007).

LOX é um importante regulador de hipóxia, induzindo a progressão tumoral através do mecanismo dependente via HIF-1α em vários tipos de tumores, tais como, mama, cabeça e pescoço, próstata, carcinomas de células renais e de câncer cervical (Semenza & Wang, 1992; Wang et al., 1995; Carmeliet et al., 1998; Harris, 2001; Erler et al., 2006; Erler et al., 2009; Allen et al., 2011; Yang et al., 2013) (Figura 4).

A estabilização de HIF-1 α aumenta diretamente a transcrição de *LOX* (Erler et al., 2006). HIF-1 α pode ser estabilizado em diferentes condições de hipóxia (Hirota et al., 2009). Portanto, as circunstâncias em que o HIF-1 α é induzido sob condições não hipóxicas pode levar a expressão de *LOX*. O aumento da densidade de células foi capaz de levar a uma maior expressão de *LOX* em condições de normóxia através de E2F1, um regulador de proliferação celular e apoptose, indicando uma nova ligação entre a regulação do ciclo celular e remodelamento da matriz extracelular (Goto et al., 2013).

LOX aumenta a expressão do gene que codifica o HIF-1 α (*HIF1A*) em modelo *in vitro* e *in vivo* de carcinoma colorretal, através da ativação da via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase / proteína quinase b (PI3K/Akt), levando a um aumento da proliferação (Pez et al., 2011). Esta mesma via regula a migração e invasão de células tumorais epiteliais de ovário, promovendo, assim, a metástase de melanoma (Albinger et al., 2010) e câncer de mama (Erler et al., 2006), de cabeça e pescoço (Le et al., 2009); de colorreto (Baker et al., 2013); pulmão (Ping et al., 2013) de ovário (Ji et al., 2013). *LOX* produzido pelas células tumorais promove a metástase através do recrutamento de células derivadas da medula óssea para os nichos metastáticos (Erler et al., 2009). Além disto, *LOX* potencializa a colonização metastática através da ação enzimática de promover ligações cruzadas de colágeno (Cox et al., 2013).

LOX está ativamente envolvido na polaridade das células e no processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM). TEM é um processo que normalmente ocorre nos estágios iniciais da embriogênese, também desempenha um papel crítico na disseminação e metástase das células tumorais (Levayer & Lecuit, 2008; Yang & Weinberg, 2008). Caracteriza-se por diminuição da expressão de marcadores epiteliais, como E-caderina, perda de adesão célula-célula e da polaridade celular, aumento da expressão de marcadores mesenquimais, reorganização do citoesqueleto e aumento da motilidade celular (Yang & Weinberg, 2008). A hipóxia reprime a expressão de E-caderina e promove a TEM (Higgins et al., 2007). HIF-1 α aumenta a TEM através da indução da migração de células epiteliais via aumento da expressão de *LOX* (Higgins et al., 2007; Schietke et al., 2010). Como consequência, ocorre repressão da expressão de E-caderina, possivelmente através da estabilização de fator de transcrição Snail

(Sahlgren et al., 2008; Schietke et al., 2010). O fator de transcrição FoxM1b (*forkhead Box M1b*) induz a expressão de LOX e ativa a via Akt-Snail, levando à TEM em carcinoma hepatocelular (Park et al., 2011).

Figura 4: Papel de LOX em várias vias de sinalização em câncer. LOX regula direta ou indiretamente a sinalização, transcrição e tradução, levando a alterações na proliferação, adesão e motilidade celular. FAK: quinase de adesão focal, AKT-PI3K: proteína quinase B-fosfatidilinositol-3-quinase, HIF1 α : fator induzido por hipóxia 1 α . Adaptado de Cox & Erler (2013).

Para o processo de metástase, é necessário que o tumor primário estabeleça um nicho pré-metastático em outro órgão. LOX secretado pelas células tumorais é capaz de estabelecer este nicho, através da sua ação no estabelecimento de ligações cruzadas de colágenos I e IV. Esta MEC mais densa é capaz de atrair células derivadas da medula óssea, que secretam MMP-2 e formam uma área mais propícia para a invasão de células tumorais circulantes (Erler et al., 2009).

Recentemente foi demonstrado também que LOX desempenha um papel importante na angiogênese, ativa a proteína quinase b (Akt) através da estimulação do receptor β do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR β), resultando no aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Barker et al., 2013) (Figura 4). A expressão de LOX correlacionou-se com a de VEGF e a de formação de vasos em amostras de

câncer colorretal e de mama (Barker et al., 2013). O aumento da expressão de VEGF é regulado pelo aumento da rigidez da matriz através de ligações cruzadas de colágeno pela ação de LOX via integrina $\beta 1$ (Mammoto et al., 2013; Dong et al., 2014). LOX é expresso também pelas células endoteliais tumorais, levando também à promoção de formação de novos vasos (Osawa et al., 2013).

1.2.4. Família das lisil oxidases e câncer

Tanto um aumento, quanto uma diminuição da expressão dos outros membros da família de LOX tem sido relatado em diversos tipos de câncer, semelhantemente ao que ocorre com LOX (Tabela 1). Além disso, os membros possuem funções tanto intra quanto extracelulares, sugerindo também papéis complexos e paradoxais como supressores de tumor e promotores de progressão tumoral.

1.2.4.1. Família das lisil oxidases como supressora de tumor

O papel de supressores de tumores foi descrito para *LOXL1* e *LOXL4* em câncer de bexiga humana, no qual os genes são silenciados por metilação, resultando na baixa expressão. Além disto, a reintrodução de *LOXL1* e *LOXL4* levou à inibição da ativação da via oncogênica ERK mediada por *ras* em células de câncer de bexiga *in vitro* (Wu et al., 2007a).

Tabela 1: Descrição do envolvimento dos genes da família das lisil oxidases em diversos tipos de câncer

Tipo de tumor	Membro	Papel	Referências
Colorretal	LOX	↑expressão	Kaneda et al., 2004; Kim et al., 2009; Baker et al., 2011 e 2012
	LOXL2	↓expressão	Brekhaman et al., 2011; Baker et al., 2013
Pâncreas	LOX	↓expressão	Kaneda et al., 2004
	LOXL2	↑expressão	Barry-Hamilton et al., 2010; Min et al., 2010
Mama	LOX	↑expressão	Ross et al., 2000; Payne et al., 2005; Erler J et al., 2006; Erler et al., 2009; Taylor et al., 2009; Chen et al., 2012; Min et al., 2010; Ren et al., 2011; Sato et al., 2011
	LOXL2	↓expressão	Kirchmann et al., 2002; Akiri et al., 2003; Perou et al., 2000; Narahara et al., 2006; Hollosi et al., 2009; Moreno-Bueno et al., 2011; Chu et al., 2012
Melanoma	LOX	↓expressão	Kirchmann et al., 2002
	LOXL3	↓expressão	Peinado et al., 2005
Cabeça e pescoço	LOX	↑expressão	Erler J et al., 2006; Le et al., 2009; Albinger et al., 2010
	LOXL2	↑expressão	Chung et al., 2006
	LOXL4	↑expressão	Görög et al., 2008; Scola et al., 2010; Holtmeier et al., 2003
Laringe	LOXL2	↑expressão	Barry-Hamilton et al., 2010
Pulmão	LOX	↑expressão	Gao et al., 2010; Wilgus et al., 2011; Lee et al., 2011; Sanches et al., 2011; Wilgus et al., 2011
	LOXL2	↑expressão	Peinado et al., 2008; Li et al., 2011
		↓expressão	Zhan et al., 2012
Gástrico	LOX	↑expressão	Kaneda et al., 2004; Brekhaman et al., 2011; Yoon et al., 2011; Zhang et al., 2013
	LOXL2	↑expressão	Barry-Hamilton et al., 2010; Peng et al., 2009
Próstata	LOX	↑expressão	Kirchmann et al., 2002; Lapointe et al., 2004; Palamakumbura et al., 2009
Esôfago	LOX	↑expressão	Sakay et al., 2009
	LOXL2	↑expressão	Barry-Hamilton et al., 2010; Li et al., 2012
Endométrio	LOXL2	↑expressão	Barry-Hamilton et al., 2010
Ovário	LOXL2 LOXL3	↑expressão	Sebban et al., 2009
Testículo	LOXL2	↑expressão	Barry-Hamilton et al., 2010
Hepático	LOXL2	↑expressão	Barry-Hamilton et al., 2010
Renal	LOX	↑expressão	Ross et al., 2000; Stassar et al., 2001; Young et al., 2001; Takahashi et al., 2001
	LOXL2	↑expressão	Barry-Hamilton et al., 2010
Pele	LOX	↑expressão	Bouez et al., 2006
Tumor de Ewing	LOX	↑expressão	Agra et al., 2013
Bexiga	LOXL1, LOXL4	↓expressão	Wu et al., 2007a
Cavidades serosas	LOXL4	↑expressão	Sebban et al., 2009
Cérebro - astrocitomas	LOX LOXLs	↑expressão ???	Laczko et al., 2007

O papel de gene supressor de tumor para *LOXL2* foi também descrito, embora alguns tenham sido incapazes de validar suas descobertas em amostras clínicas. *LOXL2* está localizado na região cromossômica 8p21-22 que é frequentemente deletada em câncer de próstata, e uma diminuição significativa na expressão *LOXL2* foi observada em várias amostras de tumor da próstata (Schmidt et al., 2007). Uma baixa expressão de *LOXL2* foi também descrita em amostras de câncer de células pequenas de pulmão e quanto menor a expressão, maior a diferenciação do tumor (Zhan et al., 2012).

1.2.4.2. Família das lisil oxidases como promotora de progressão tumoral

Semelhante a LOX, o aumento da expressão dos demais membros da família das lisil oxidases já foi descrito em diversos tumores (Tabela 1), inclusive correlacionando com prognóstico de pacientes com tumor de ovário, mama, laringe, cabeça e pescoço, pulmão, pâncreas, cólon, reto e melanoma (Xiao & Ge, 2012; Nishioka et al., 2012; Barker 2012; Kim et al., 2014). Apesar desta grande variedade de tumores nos quais os membros da família das lisil oxidases estão envolvidos, os trabalhos em tumores do sistema nervoso central são ainda escassos.

LOXL2, hiperexpresso em tumores de diferentes tipos, correlaciona-se com a malignidade de tumor de cólon (Fong et al., 2007) e progressão de adenocarcinoma de pulmão (Zhan et al., 2012), promove a sobrevivência e quimioresistência de células tumorais de pâncreas (Ruckert et al., 2010), regula a adesão, motilidade e invasão celular de câncer gástrico (Peng et al., 2009), além de se correlacionar com invasão do tumor, metástase linfática e baixa sobrevida de pacientes com câncer gástrico e de esôfago (Peinado et al., 2008; Peng et al., 2008; Li et al., 2012). Em câncer de mama, a alta expressão de *LOXL2* está associada com um tumor maior agressivo (Peinado et al., 2008; Barry-Hamilton et al., 2010; Barker et al., 2011; Moreno-Bueno et al., 2011; Akiri et al., 2003) e também com metástase e menor sobrevida de pacientes com tumor negativo para o receptor de estrógeno (Barker et al., 2011; Ahn et al., 2013; Kim et al., 2014).

Além disso, *LOXL2* está incluído entre os 75 genes que compõem a assinatura de biomarcadores de prognóstico para aumento do risco de recorrência de carcinoma de cabeça e pescoço (Chung et al., 2006).

LOXL2 desempenha todos estes papéis na promoção tumoral por um mecanismo semelhante ao *LOX*, ativando a via FAK (Peng et al., 2009), promovendo a TEM, metástases (Canesin et al., 2014; Cuevas et al., 2014) e a angiogênese (Zaffryar-Eilot et al., 2013). Além disto, a expressão de *LOXL2* também é regulada por HIF-1 α (Schietke et al., 2010).

Com relação a *LOXL4*, sua expressão em câncer está relacionada com hipóxia em câncer colorretal (Kim et al., 2006). Em tumores de cabeça e pescoço, *LOXL4* está mais expresso em casos com maior grau de displasia e metástase de linfonodos (Holtmeirer et al., 2003; Görögh et al., 2008; Weise et al., 2008). A expressão de *LOXL4* também é regulada de uma maneira dependente de HIF-1 α quando células de câncer de mama foram submetidas a hipóxia, além de promover o remodelamento de colágeno da MEC (Wong et al., 2011).

Em uma análise de tumores das cavidades serosas (carcinomas de mama e ovário e mesotelioma maligno), *LOXL2*, *LOXL3* e *LOXL4* aparentemente apresentaram papéis opostos (Sebban et al., 2009). Os resultados são um pouco confusos, pois relatam um aumento dos níveis de *LOXL2* e uma diminuição dos níveis de *LOXL3* em células de carcinoma da mama encontrados em derrame pleural comparados com tumores primários, sugerindo que *LOXL2*, mas não *LOXL3*, está envolvido na disseminação de células tumorais do sítio primário. No entanto, embora os níveis de *LOXL3* também estivessem diminuídos em derrames de carcinoma de ovário, estavam aumentados nas lesões metastáticas do mesmo paciente, sugerindo que *LOXL3*, pode ter um papel no crescimento do tumor nos sítios primários e metastáticos, ao invés de ter um papel na disseminação das células de tumor primário (Sebban et al., 2009).

A Figura 5 mostra um esquema da diversidade de funções que a família das lisil oxidases desempenha em tumores.

Figura 5: Papel dos membros da família das lisil oxidases na progressão tumoral. O aumento da expressão de membros da família das lisil oxidases em tecido hospedeiro pré-maligno está associado com maior incidência de tumores através da transformação maligna e via remodelamento ativo do microambiente local, o que leva a maior secreção e deposição de componentes da matriz extracelular (MEC), com aumento da sua estabilização, formação de ligações cruzadas e rigidez do tecido (desmoplasia). É importante notar que a expressão de LOX não está aumentada em tumores malignos não invasivos. O aumento da expressão de membros da família das lisil oxidases em tumores primários é observado nos tumores invasivos e leva a um maior remodelamento da MEC, o que aumenta a proliferação, invasão e migração através da indução para a transição epitelial para mesenquimal (TEM). A expressão de membros da família das lisil oxidases, também está correlacionada clinicamente com o aumento de doença metastática e baixa sobrevida dos pacientes. Estas proteínas são necessárias em sítios metastáticos secundários para crescimento e colonização. Figura adaptada de Barker et al. (2012).

1.2.5. Família das lisil oxidases como alvos terapêuticos

Membros da família das lisil oxidases têm sido estudados como possíveis alvos de intervenções terapêuticas devido às funções em diversos tipos de tumores. Apesar dos membros da família apresentarem papéis opostos como supressores de tumor ou promoverem a progressão tumoral, estratégias diversas visam o direcionamento terapêutico para LOX e LOXL2 principalmente no tratamento de metástases.

Estudos têm analisado a eficácia de um anticorpo monoclonal contra LOXL2 na redução do microambiente patológico associado com câncer. Foram observadas reduções nos fibroblastos ativados, desmoplasia e células endoteliais, bem como, a diminuição na produção de fatores de crescimento e citocinas e diminuição na sinalização de TGF β . Em modelos de ratos foi

observada uma diminuição no crescimento do tumor primário. Este anticorpo contra LOXL2 poderá, portanto, representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da fibrose e do câncer (Erler et al., 2006; Levental et al., 2009; Peng et al., 2009; Barry-Hamilton et al., 2010; Baker et al., 2011).

A inibição de LOX pelo tratamento com BAPN, anticorpos ou RNA de interferência específicos de LOX resultou na inibição de metástases de pulmão e de fígado em modelos de camundongos transgênicos e xenográficos (Erler et al., 2006). BAPN também inibe a atividade de LOXL2 e LOXL4 em modelos *in vitro* e *in vivo* (Kim et al., 2003; Barry-Hamilton et al., 2010). No caso de LOX, o bloqueio da atividade enzimática (química ou imunológica), em oposição à expressão da proteína (utilizando RNA de interferência), permitiu que os efeitos supressores de tumor de LOX-PP se manifestem. No entanto, os dados não mostraram uma diminuição na formação do tumor primário como seria esperado, corroborando o papel de LOX como um promotor de metástase. BAPN foi utilizado topicamente para tratamento de cicatriz hipertrófica fibrótica e cicatrizes queloides em humanos, mas estes ensaios clínicos foram interrompidos devido à toxicidade não relacionada à tumorigênese (Kumar et al., 1990; Martin et al., 1991). Entretanto, o tratamento sistemático com BAPN durante o desenvolvimento de zebrafish levou a efeitos teratogênicos (Gasner et al., 2007; Boxtel et al., 2010). Em modelo animal de glioblastoma, BAPN interferiu na estrutura do colágeno do tumor e inibiu a angiogênese e o crescimento tumoral (Mammoto et al., 2013).

A inibição de LOXL2 com anticorpos foi realizada em modelos *in vivo* de tumor (Peng et al., 2009; Barry-Hamilton et al., 2010; Baker et al., 2011; Moreno-Bueno et al., 2011). Três destes estudos mostraram que o tratamento de camundongos com tumores ortotópicos de mama ou gástrico levou a uma diminuição do crescimento do tumor primário (Peng et al., 2009; Barry-Hamilton et al., 2010; Moreno-Bueno et al., 2011). Por outro lado, em outro estudo de câncer de mama não foi observado nenhuma alteração no crescimento do tumor, seja por *knockdown* do gene ou após inibição com anticorpo contra LOXL2 (Baker et al., 2011). Estes dados discrepantes podem ser explicados devido a diferentes afinidades dos anticorpos ou mesmo às diferenças dos modelos de camundongos utilizados. Além disso, a inibição do gene *LOXL2*, comparada com

a inibição de sua função enzimática pode resultar em efeitos diferentes na progressão do tumor. O *knockdown* genético de LOXL2 em modelos de camundongo de carcinoma células escamosas, levou a reexpressão da E-caderina, aumento da apoptose, diminuição da angiogênese e da expressão de MMP9 nos tumores (Peinado et al 2005), enquanto que a inibição de LOXL2 secretada através de um anticorpo em um modelo de camundongo com câncer gástrico não apresentou efeito sobre a expressão de Snail ou da E-caderina. Na utilização de anticorpo contra LOXL2, sugeriu-se que a inibição da ativação de Src e FAK foi responsável pelos efeitos de LOXL2 secretada na progressão do tumor (Peng et al., 2009).

Outra interessante abordagem, embora indireta, tendo como alvos os membros da família das lisil oxidases. São ensaios clínicos em que pacientes com tumor de mama metastático foram tratados com tetratiomolibdato (TM), um agente quelante de cobre, que previne a absorção celular do cobre. Pacientes tratados com TM apresentaram estabilização da doença durante vários meses e, em alguns casos, até regressão (Goodman et al., 2005). O tratamento com TM em modelo animal de câncer de mama comprometeu o crescimento do tumor mamário, inibindo a formação de vasos sanguíneos funcionais e diminuindo a ativação da sinalização de NF- κ B (Pan et al., 2002). A ligação do domínio de cobre aos membros da família das lisil oxidases, é importante para a sua atividade catalítica, e os níveis dos transcritos e das proteínas da família das lisil oxidases não foram diretamente afetados pelo tratamento com TM. Em modelo *in vivo* de câncer de cabeça e pescoço, o tratamento com TM diminuiu a formação de metástases através da inibição da atividade de LOX e ativação de FAK (Kumar et al., 2010).

D-penicilamina é outro quelante de cobre que foi utilizado em modelo de GBM em camundongo e teve efeito antiangiogênico na formação do tumor cerebral (Mammoto et al., 2013).

Membros da família das lisil oxidases desempenham um papel fundamental na regulação da sobrevivência das células tumorais em resposta a hipóxia, através da modulação que envolve a MEC. Além disso, a família das lisil oxidases, juntamente com outros genes regulados pela hipóxia, pode ser responsável por contribuir com os efeitos das drogas anti-hipóxia. Vários grupos

também mostraram que a inibição da resposta à hipóxia pode inibir a progressão e metástase tumoral (Bennewith et al., 2011).

O potencial de LOXL1, LOXL3 e LOXL4 como alvos terapêuticos para o desenvolvimento de drogas anticâncer não foi investigado devido a poucas evidências destas proteínas atuarem como promotoras de tumor. A alta expressão de LOXL4 é significativamente correlacionada com metástase linfonodal em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço (Görögh et al., 2007), sugerindo que LOXL4 pode ser um bom alvo. Curiosamente, células dendríticas modificadas que expressam LOXL4 foram capazes de estimular as células T a secretar níveis aumentados de interferon- γ (IFN- γ), uma citocina antitumoral, sugerindo que estas células dendríticas poderiam ser utilizadas como vacina para o tratamento de pacientes com tumor de cabeça e pescoço (Weise et al., 2008).

LOX e LOXL1 são secretadas como pró-enzimas, as quais são ativadas por BMP1, e a inibição ou silenciamento de BMP1 reduziu o nível de LOX ativo *in vitro* (Uzel et al., 2001). Entretanto, BMP1 é extremamente importante no desenvolvimento de osso e cartilagem, tornando impossível sua inibição para bloquear os efeitos de LOX e LOXL1.

No desenvolvimento de qualquer nova abordagem terapêutica, uma compreensão clara do papel que a proteína ou a família de proteína desempenha é essencial. Levando em consideração a complexidade do envolvimento dos membros da família das lisil oxidases nos vários estágios do desenvolvimento do câncer, é pouco provável que inibindo somente um dos membros seja suficiente. Portanto, terapias combinadas visando atingir vários membros da família ou mesmo a inibição da resposta celular desencadeada por estas proteínas podem ser uma alternativa no tratamento de diversos tipos de câncer.

1.3. IDH1

O gene isocitrato desidrogenase (*IDH*) codifica uma proteína que catalisa a carboxilação oxidativa do isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG) e reduz NADP^+ em NADPH (Watanabe et al., 2009). Existem 5 isoenzimas IDHs, sendo as mais importantes as IDH1 e IDH2. Os genes *IDH1* e *IDH2* apresentam uma alta homologia em suas sequências e uma estrutura proteica quase idêntica.

O IDH1, localizado no citoplasma, é hiperexpresso no fígado e em concentrações menores nos outros tecidos. Participa do metabolismo de lipídios e da glicose nas células e está envolvido na defesa celular contra espécies reativas de oxigênio e radiação (Haselbeck et al., 1993; Joseph et al., 2006; Reitman et al., 2010). O IDH2 está localizado na mitocôndria, é hiperexpresso no coração, músculo e linfócitos ativados e moderadamente expressos em outros tecidos. Apresenta função importante na regulação do ciclo de Krebs e também contra insultos como estresse oxidativo (Minard et al., 1999; Lee et al., 2004; Lee et al., 2009).

1.3.1. Mutações de *IDH1*

O sequenciamento do exoma de GBMs identificou uma mutação somática no *IDH1* em 18 (12%) de 149 casos (Parsons et al., 2008). Estudos subsequentes demonstraram que a mutação é muito mais frequente em AGII (80%), AGIII e GBMs secundários (70-88%) do que em GBMs primários (5%), sendo um fator preditivo de melhor sobrevida (Dubbink et al., 2009; Watanabe et al., 2009; Weller et al., 2009; Wick et al., 2009; Yan et al., 2009).

A mutação mais frequente é uma alteração em heterozigose no códon 132, com substituição de uma arginina por histidina (R132H) onde se localiza o sítio ativo da enzima. Um estudo com mais de mil gliomas difusos demonstrou que a mutação *IDH1* (R132H) está associada às neoplasias astrocitárias, enquanto a *IDH2* ocorre predominantemente em tumores derivados de oligodendrócitos (Hartmann et al., 2009). Estes achados fazem da mutação *IDH1* a alteração genética mais frequente e consistente nos AGII. Existe uma forte associação entre a presença da mutação *IDH1* com mutação *TP53* ou deleção 1p/19q (Watanabe et al., 2009; Liang et al., 2010; Van Den Bent et al., 2010).

A forma mutante de IDH1 forma um heterodímero com a forma não mutada que é cataliticamente inativo e, conseqüentemente, diminuição da formação de α -KG. O α -KG no citoplasma inicia a degradação, dependente de oxigênio, de HIF-1 α . Portanto, a redução da formação de α -KG aumenta os níveis de HIF-1 α (Zhao et al., 2009). Além disto, a mutação *IDH1* não somente resulta em perda de função, mas confere a habilidade de catalisar α -KG em 2-hidroxioglutarato (2HG), reação dependente de NADPH. A função de 2HG não está totalmente esclarecida, sendo possível sua contribuição na gliomagenese, através da inibição das atividades enzimáticas dependentes de α -KG (Dang et al., 2009; Xu et al., 2011). Desta forma, *IDH1* atuaria como um oncogene, presumindo que 2HG aumenta os níveis de HIF-1 α através da inibição da prolil hidroxilase (PHD), responsável pela hidroxilação e degradação de HIF-1 α (Frezza et al., 2010). Recentemente, vários genes regulados por HIF-1 α , entre eles o *LOX*, apresentaram diminuição da expressão em gliomas com mutação de *IDH1*, quando comparados com casos sem mutação (Chesnelong et al., 2014).

1.4. Racional do projeto

Os astrocitomas difusamente infiltrativos possuem características invasivas. Além disto, os GBMs, os mais comuns e mais malignos dos astrocitomas, apresentam alto potencial proliferativo, necrose e neoangiogênese. Mesmo após cirurgia e tratamentos adjuvantes disponíveis atualmente, a sobrevida média dos pacientes é de 15 meses. Deste modo, considerando o papel de *LOX* e demais membros da família na proliferação, migração, invasão e angiogênese descrita em diversos tipos de tumores e a escassez de dados em tumores do sistema nervoso central, a análise de sua expressão em astrocitomas de diferentes graus pode esclarecer os mecanismos de atuação envolvidos nestes tumores e potencialmente contribuir na busca de marcadores de progressão, prognóstico avanços na busca de novos alvos terapêuticos.

2 *OBJETIVOS*

O presente projeto possui como objetivos:

- 1- Analisar os níveis de expressão dos genes da família das lisil oxidases (*LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* e *LOXL4*), *BMP1* e *HIF1A* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos não neoplásicos;
- 2- Correlacionar os dados moleculares de expressão dos genes nos astrocitomas de diferentes graus entre si e com os dados de tempo de sobrevida total;
- 3- Analisar a expressão dos genes em relação ao status de mutação de *IDH1*;
- 4- Analisar a expressão das proteínas da família das lisil oxidases;
- 5- Estudar o papel funcional de *LOX* em linhagens de glioblastoma humano U87MG e A172.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

As amostras de astrocitomas de diferentes graus e de tecido cerebral não neoplásico foram coletadas durante o procedimento cirúrgico e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido após ressecção pelo grupo de Tumores Encefálicos e Metástases da Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). As amostras de tecido não neoplásico foram coletadas do lobo temporal de paciente com epilepsia durante procedimento cirúrgico realizado pelo grupo de Epilepsia da mesma Divisão. Todos os tecidos utilizados no presente estudo possuem confirmação histopatológica da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP, de acordo com a classificação da OMS, e fazem parte do banco de amostras coletadas durante o Projeto Genoma Clínico, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob o número de protocolo 830/01, com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

O presente estudo encontra-se inserido no Projeto Temático da FAPESP nº 04/12133-6: “Procura de marcadores moleculares relacionados ao diagnóstico e prognóstico de tumores do sistema nervoso central”, aprovado pela CAPPesq (número de Protocolo 681/05). Os consentimentos pós-informados foram obtidos de todos os pacientes com tumor e epilepsia ou de seus responsáveis legais e têm sido acompanhados clinicamente com protocolos padronizados para radioterapia e quimioterapia, bem como para análise da evolução por neuroimagem.

A casuística deste projeto consiste de: 22 tecidos controles não neoplásicos (NN), 23 astrocitomas pilocíticos (AGI), 26 astrocitomas de baixo grau (AGII), 18 astrocitomas anaplásicos (AGIII) e 86 glioblastomas (GBM).

3.2. Linhagens celulares

As linhagens comerciais estabelecidas de GBM humano, U87MG e A172, foram cultivadas na forma de monocamada e mantidas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Quando necessário, foram desagregadas com tripsina/EDTA, centrifugadas e ressuspensas em meio DMEM. A quantidade e a viabilidade celular foram analisadas pelo método de exclusão por azul de Tripan em contador automático Countess (Life Technologies).

3.3. Análise da expressão gênica

3.3.1. Extração de RNA total

As amostras tumorais foram congeladas e analisadas em criocortes de 4µm corados com hematoxilina e eosina (HE) para verificação da qualidade do mesmo. Para amostras tumorais, porções de tecidos não tumorais (tecido normal ou necrose) foram dissecados previamente à extração de RNA total com RNeasy Mini Kit, de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para extração de culturas de células, as mesmas foram lisadas no tampão do próprio kit.

A qualidade do RNA extraído foi verificada através de corrida eletroforética em gel denaturante de agarose, e as concentrações e pureza das mesmas foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro por leitura a 260 e 280nm. Razões A260/A280 maiores que 1,8 foram consideradas de pureza satisfatória. As amostras foram estocadas a -70°C até sua utilização para a síntese de DNA complementar (cDNA).

3.3.2. Síntese de cDNA por transcrição reversa

O procedimento foi realizado inicialmente com digestão com DNase para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. A transcrição foi realizada com transcriptase reversa SuperScript III, inibidor de RNase (RNaseOUT), oligonucleotídeos randômicos e oligodT, seguindo as recomendações do

fabricante (Life Technologies). Após a transcrição reversa, o cDNA obtido foi tratado com 1U de RNase H a 37°C por 30min e 72°C por 10min para eliminar eventuais híbridos formados. Em seguida foi diluído em tampão Tris-EDTA (TE) e armazenado a -20°C para subsequente análise da expressão gênica.

3.3.3. Desenho de *primers*

As sequências FASTA, correspondentes ao mRNA dos genes, foram obtidas através da base de dados *Gene*, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Com o propósito de se checar a expressão gênica, os *primers* foram desenhados em éxons diferentes, eliminando o risco de possíveis amplificações de produtos referentes ao DNA genômico. Assim, os pares de *primers* foram desenhados de forma que o produto a ser amplificado estivesse no intervalo de pelo menos uma junção de éxon. Além deste, os critérios utilizados para desenho dos *primers* foram: I) maior proximidade possível da extremidade 3' do gene; II) proporção CG em torno de 50% do total de bases; III) *primers* com tamanho entre 20-25bp; IV) temperatura de anelamento entre 58 e 60°C, com diferença de temperatura preferencialmente de até 1°C entre o par de *primers*; V) limite de 3 bases repetidas em sequência; VI) ausência de estruturas secundárias como “*hairpins*”, homo e heterodímeros; VII) amplificação de um produto de tamanho entre 80-120bp; e VIII) balanço 3:2 da proporção GC:AT das cinco últimas bases da porção 3', dando preferência para que haja duas bases A/T nesta extremidade. Todos estes critérios tiveram como objetivo garantir a eficiência e especificidade da reação e ser o mais estrigente possível em relação aos mesmos. Para checagem de temperatura de anelamento, presença de estruturas secundárias e proporção CG, foi utilizado o programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os *primers* desenhados foram checados pelo *Blat* conforme sua especificidade (Kent, 2002) e *Blast-n*, do NCBI. As sequências dos *primers* foram específicas para o gene estudado. Os *primers* desenhados foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA). As sequências de nucleotídeos de *primers* específicos para análise de PCR em tempo real, bem

como o tamanho dos produtos de amplificação, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências de nucleotídeos de *primers* para a reação de PCR em tempo real e tamanho dos produtos de PCR

Gene	Produto de PCR	Orientação	Sequências (5'-3')
<i>LOX</i>	117 pb	Senso Antisenso	CCTACTACATCCAGGCGTCCA CATAATCTCTGACATCTGCCCTGT
<i>LOXL1</i>	162 pb	Senso Antisenso	GCTATGACACCTACAATGCGGA GACCTGTGTAGTGAATGTTGCATCT
<i>LOXL2</i>	112 pb	Senso Antisenso	ACCCACCCACTATGACCTGCT CTCGTAATTCTTCTGGATGTCTCCT
<i>LOXL3</i>	115 pb	Senso Antisenso	CTGGAACAGGCCGCATCT CCCCAGCATCCTCATCGT
<i>LOXL4</i>	115 pb	Senso Antisenso	GGCAGAGTCAGATTTCTCCAACA GAGTTCTGCATTGGCTGGGTAT
<i>HIF1A</i>	117 pb	Senso Antisenso	CATCCAAGAAGCCCTAACGTGT CATTTTTCGCTTTCTCTGAGAT
<i>BMP1</i>	105 pb	Senso Antisenso	CTCGTAAGTCCTCCATCAAAGCT CTCTCCATCTCCCACAGGCTC
<i>GUSB</i>	101 pb	Senso Antisenso	GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA
<i>HPRT</i>	118 pb	Senso Antisenso	TGAGGATTTGGAAGGGTGT GAGCACACAGAGGGCTACAA
<i>TBP</i>	98 pb	Senso Antisenso	AGGATAAGAGAGCCACGAACCA CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT

3.3.4. PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)

Os dados quantitativos referentes à análise de expressão dos genes analisados foram normalizados em relação à média geométrica de três genes de referência: glucuronidase beta (*GUSB*), hipoxantina fosforribosiltransferase (*HPRT*) e proteína de ligação a TATA (*TBP*) (Vandesompele et al., 2002; Kok et al., 2005; Valente et al., 2009).

Todos os ensaios foram feitos em duplicata em uma mistura de volume final 12µL, contendo 3µL de fita molde (cDNA), 6µL de power SYBR Green I Master Mix (Life Technologies) e 3µL de par de *primers* em uma concentração otimizada. As condições da reação foram: 2min a 50°C para ativação da uracil N-glicosilase, 10min de ativação da DNA polimerase a 95°C, seguido de 40 ciclos

de 15s de denaturação a 95°C e 1min de pareamento e extensão a 60°C, realizado em um aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). As reações foram repetidas quando os valores de Ct das duplicatas ultrapassaram um desvio padrão de 0,4.

A amplificação de produto único foi confirmada através da análise de curvas de dissociação. Os produtos de PCR foram também analisados em eletroforese em gel de agarose, corados com GelRed (Biotium, Hayward, CA, EUA), para confirmação da amplificação do tamanho correto do produto. Para cada reação, foram testadas concentrações finais de *primers* mínimas que não prejudicassem a eficiência da reação.

As eficiências de amplificação foram calculadas [$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$] utilizando-se diluições seriadas de cDNA. A equação $2^{-\Delta Ct}$ foi aplicada no cálculo da expressão relativa gênica para $E=100\pm 10\%$, onde $\Delta Ct = \text{média Ct gene} - \text{média geométrica do Ct dos três normalizadores}$ (Schmittgen & Livak, 2008).

3.4. Extração de DNA e sequenciamento de *IDH1*

O DNA foi extraído das amostras utilizando-se o kit QiaAmp DNA micro (Qiagen). O sequenciamento do gene *IDH1* foi realizado conforme estudo realizado pelo nosso grupo (Uno et al., 2011) por PCR, seguida por sequenciamento de DNA. Sequências de *primer* sintetizados pela IDT para a amplificação por PCR do exon 4 (5'-3'): F: CCATCACTGCAGTTGTAGGTT e R: CATACAAGTTGGAAATTTCTGG. Os produtos de PCR foram gerados numa mistura de 25µL utilizando 100 ng de DNA, 50mM de KCl, 50µM de cada dNTP, 10mM de Tris-HCl (pH 9,0), 1,5mM MgCl₂, 10pmol de cada *primer* e 1 unidade de Taq DNA polimerase (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). A PCR foi realizada com um passo de desnaturação inicial a 94°C durante 5min, seguido de 35 ciclos consistindo de 94°C durante 30s, 54°C durante 30s e a 72°C durante 30s. Após o ciclo final, foi realizada um período de extensão de 10 min. a 72°C. Os produtos de PCR (436pb) foram purificados com uma coluna GFX (GE Healthcare) e sequenciados num sequenciador de DNA ABI Prism 3130 automatizado utilizando o kit *Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing* versão 3.1

(Applied Biosystems). Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os mesmos que os utilizados para a PCR. Os resultados foram analisados e comparados com a sequência do banco público *GenBank*, RefSeq NM_005896.

3.5. Ensaios funcionais

3.5.1. Silenciamento gênico por RNA de interferência pequeno

O estudo do papel do gene *LOX* em tumores foi realizado através do silenciamento da expressão gênica por siRNA (*small interference RNA*) nas linhagens celulares de GBM humano U87MG e A172. A transfecção transitória foi realizada com Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) e siRNA para *LOX* (RNA dupla fita de 27 mers, 5'-GUAUUACAGAAUUGAAACACUGUGUU-3') sintetizado pela IDT). Como controle experimental, foi realizada transfecção com um oligonucleotídeo sem homologia com genes humanos (*Non-Targeting Control* - NTC). As concentrações finais de siRNA foram de 1nM. O controle sem transfecção, denominado parental, também foi incluído. A Lipofectamina e os oligonucleotídeos foram diluídos separadamente em meio 250µL de *Opti-MEN / Reduced Serum* (Life Technologies). Após 5min a temperatura ambiente, ambos foram misturados na proporção 1:1 e incubados por 20min a temperatura ambiente. A transfecção foi realizada adicionando-se a solução nos poços contendo 1×10^5 células em placas de seis poços, em meio DMEN com 10% SFB sem antibióticos. Após 24h, o meio foi trocado. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Para cada experimento, foi determinada a análise da eficiência do silenciamento através da análise da expressão de *LOX* por qRT-PCR, utilizando-se *HPRT* como gene de referência. Os cálculos da expressão das células transfectadas com siRNA de *LOX* foram realizados em relação ao controle NTC.

3.5.2. Curva de proliferação

As células transfectadas com siRNA ou controles em triplicatas foram mantidas sob condições de cultura em placas de 6 poços com meio DMEM suplementado com 10% de SFB em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂. Após 2, 4 e 7 dias de transfecção as células foram tripsinizadas e contadas pelo método de exclusão de células coradas pelo azul de Tripán (Freshney, 1987) em contador automático Countess (Life Technologies).

3.5.3. Ensaio de migração e invasão celular

A capacidade de migração e invasão foi avaliada por meio da habilidade das linhagens celulares atravessarem uma membrana com poros de 8µm de diâmetro (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Para o experimento de invasão foram utilizados insertos contendo matrigel, (BD Biocat Matrigel Invasion Chamber, da BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Após 48h de transfecção, as células foram mantidas em meio DMEM, com 1% SFB durante 2h. A seguir foram tripsinizadas, contadas, e um total de $2,5 \times 10^4$ células foram plaqueadas nos insertos por 18h a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, as células que passaram através do filtro foram fixadas com paraformaldeído 4%, coradas com cristal violeta 0,2% e 20% de metanol e analisadas por microscopia de luz (aumento de 10x). A quantificação tanto para os ensaios de migração quanto para os ensaios de invasão foi realizada por contagem de 18 campos diferentes de cada um dos insertos das duplicatas experimentais. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas independentes.

3.5.4. Tratamento com BAPN (β-aminopropionitrile)

Para testar a atividade de LOX, as células U87MG e A172 foram tratadas com 100mM de BAPN (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Após 24h de ensaio com a droga, as células foram tripsinizadas e contadas. Um total de $2,5 \times 10^4$ células foram plaqueadas nos insertos. Após 4h de ensaio, a droga foi novamente adicionada nas células e mantida por 18h, à 37°C, em atmosfera de

5% CO₂. As células que passaram através da membrana com poros de 8µm de diâmetro (BD Biosciences) foram fixadas com paraformaldeído 4%, coradas com cristal violeta 0,2% e 20% de metanol e analisadas por microscopia de luz (aumento de 10x). A quantificação foi realizada por contagem de 18 campos diferentes de cada um dos insertos das duplicatas experimentais. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas independentes.

3.5.5. Crescimento em suspensão de agarose

Placas de 6 poços foram preenchidas com 500µL de agarose 0,6% em DMEM/10% SFB. Sobre esta camada de agarose foram plaqueados 500µL de 1×10^3 células em resssuspensas em agarose 0,3% em DMEM/10% SFB. Após 24h, foram adicionados em cada poço 500µL de DMEM /10% SFB. Esta camada superior de meio líquido foi trocada a cada 3 dias. Após 15 dias, as colônias foram fixadas com formaldeído 2%, coradas com cristal violeta 2% e contadas em aumento de 40x em microscópio invertido.

3.6. Análise da expressão proteica

3.6.1. Western blotting

Foram preparados lisados das culturas de células transfectadas com siRNA e controle. A lise foi realizada com tampão de lise RIPA e coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, Saint Louis, CA, EUA) em gelo. A concentração de proteínas foi determinada através do ensaio de proteína com reagente Bradford (Bio-Rad Laboratories, EUA). A absorbância foi medida a 595nm utilizando um espectrofotômetro de microplacas Multiskan Espectro (Thermo Labsystems, Helsinki, Finlândia). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os cálculos foram realizados com curva padrão com diferentes concentrações de albumina bovina (2 a 0,125mg/mL). Trinta µg do lisado de proteínas totais foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em tampão de corrida Tris-Glicina com SDS (Mini Protean TGX, Bio-Rad). Foi utilizado um marcador padrão de peso molecular de proteína SpectraTM

Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através do sistema iBLOT (iBlot® Dry Blotting System, Life Technologies). A membrana foi bloqueada com leite desnatado 5% e incubada com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-LOX (1:1000) (Sigma-Aldrich). A membrana foi incubada também com o anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -actina (clone AC-74, Sigma-Aldrich) como controle de massa de proteína aplicada. A incubação com os anticorpos primários foi realizada à temperatura ambiente por 2h e sob agitação constante. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de coelho (1:1000) e de camundongo (1:5000) conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich) sob agitação constante por 90min. A detecção foi realizada com reagente de quimiluminescência (*Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus*, Perkin Elmer, MA, EUA). A revelação da membrana foi realizada no equipamento ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

3.6.2. Imuno-histoquímica

O procedimento imunoistoquímico para as proteínas LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 e LOXL4 foi realizado em cortes de 4 μ m em lâminas de tecidos incluídos em parafina. Cortes de tecido foram inicialmente processados e submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato 10mM, pH 6,0, e incubadas a 122°C por 3min utilizando Pascal elétrica (*BioCare Medical, Walnut Creek, USA*). As amostras foram então incubadas para bloqueio de peroxidase endógena (Sistema *Novolink, Novocastra, Newcastle-upon-Tyne*, Reino Unido) e posteriormente incubadas com os anticorpos primários, na diluição final de acordo com a Tabela 3, em temperatura 16-20°C, por 16h. A reação foi revelada utilizando kit comercial (*Novolink, Novocastra*) em temperatura ambiente utilizando diaminobenzidina e hematoxilina de Harris para a coloração nuclear. Para todas as reações, foram utilizados controles positivos (Tabela 3).

A análise semiquantitativa foi realizada considerando-se tanto a intensidade quanto a porcentagem de células ou estruturas marcadas. Considerou-se para intensidade de marcação: 0=negativo, 1=fraco, 2=moderado, 3=forte; e para a porcentagem de células marcadas: 1=1-25%,

2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100%. O índice de marcação foi obtido pelo produto da intensidade de marcação pela porcentagem de estruturas marcadas. Todas as reações foram analisadas por dois observadores independentes.

Tabela 3: Especificações dos anticorpos primários utilizados para imuno-histoquímica

Antígeno	Especificidade	Fornecedor	Controle positivo	Diluição final
LOX	Policlonal de coelho	Abcam	Placenta	1:400
LOXL1	Policlonal de coelho	Sigma-Aldrich	Esôfago	1:100
LOXL2	Policlonal de coelho	Abcam	Placenta	1:100
LOXL3	Policlonal de coelho	Aviva	Placenta	1:50
LOXL4	Policlonal de coelho	Aviva	Testículo	1:100

3.7. Análises estatísticas

Os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram utilizados para verificação da distribuição dos dados. Para análise da distribuição da expressão dos genes estudados na casuística de amostras NN e de astrocitomas de diferentes graus de malignidade, foi utilizada comparação através do teste não paramétrico de Dunn. As análises estatísticas de expressão dos casos com e sem mutação no gene *IDH1*, assim como para os ensaios funcionais, foram realizadas através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados de imuno-histoquímica semiquantitativos de diferentes grupos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

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

As curvas de sobrevivência Kaplan Meier dos pacientes com GBM foram analisadas utilizando-se o teste log rank (Mantel cox), excluindo-se 9 casos de

recidivas de pacientes com GBM. Os casos foram divididos em hipo e hiperexpressão dos genes baseando-se na mediana dos níveis de expressão dos genes.

A significância estatística foi estabelecida quando $p < 0,05$. Todos os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do programa SPSS versão 15.0 (IBM, Armonk, EUA) e os gráficos de dispersão foram feitos com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA).

4 *RESULTADOS*

4.1. Análise de expressão gênica

4.1.1. Otimização das reações de PCR em tempo real

Os níveis de expressão de mRNA dos genes *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3*, *LOXL4*, *BMP1* e *HIF1A* foram quantificados através da qRT-PCR. As reações foram otimizadas inicialmente para cada gene com relação às concentrações mínimas dos primers para todos os genes alvos e os genes de referência. Todos os pares de primers foram analisados quanto à sua eficiência de amplificação. Curvas de amplificação e de eficiência de amplificação foram realizadas com diluições seriadas de um *pool* de cDNA de linhagem celular de GBM e estão apresentadas na Figura 6 e 7. A Tabela 4 mostra as concentrações dos *primers* e as eficiências determinadas para todos os genes.

Figura 6: Curvas de amplificação e curvas padrões para determinação das eficiências de amplificação de PCR em tempo real dos genes *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2* e *LOXL3*. As curvas de amplificação foram determinadas com diluições seriadas de cDNA e as eficiências de amplificação foram calculadas pelos dados de slope das curvas padrões.

Figura 7: Determinação das eficiências de amplificação de PCR em tempo real dos genes *LOXL4*, *BMP1* e *HIF1A*. As curvas de amplificação foram determinadas com diluições seriadas de cDNA e as eficiências de amplificação foram calculadas pelos dados de slope das curvas padrões.

Tabela 4: Concentrações de *primers* para a reação de PCR em tempo real e eficiências de amplificação.

Genes	Concentrações dos <i>primers</i> (nM)	Eficiências de amplificação (%) *
<i>LOX</i>	200	99
<i>LOXL1</i>	200	91
<i>LOXL2</i>	200	97
<i>LOXL3</i>	200	99
<i>BMP1</i>	200	105
<i>HIF1A</i>	100	90
<i>GUSB</i>	400	101
<i>HPRT</i>	200	118
<i>TBP</i>	200	98

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

A Figura 8 mostra as curvas de dissociações com picos únicos dos produtos de PCR para cada um dos genes e a Figura 9, a eletroforese em gel de agarose para confirmação do tamanho do produto de PCR amplificados.

Figura 8: Curvas de dissociações dos produtos de PCR em tempo real dos genes *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3*, *LOXL4*, *BMP1* e *HIF1A*. As reações foram realizadas e no final a temperatura foi elevada gradativamente para a determinação da temperatura de dissociação. As curvas mostram as derivadas da fluorescência das reações (eixo y) e as temperaturas (eixo x).

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR em tempo real de *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3*, *LOXL4*, *BMP1*, *HIF1A*, *GUSB*, *HPRT* e *TBP*.

4.1.2. Análise de expressão gênica em astrocitomas

Após a otimização de cada par de primers, a expressão de cada um dos genes foi avaliada em 22 amostras de tecido controle não neoplásico (NN) e 153 amostras de astrocitomas (23 AGI, 26 AGII, 18 AGIII e 86 GBM). =

LOX apresentou grande variação de expressão em todos os graus de astrocitomas. A expressão dos casos de GBM se mostrou aumentada em relação ao grupo controle. Há um aumento na expressão de *LOX* em AGI em comparação ao AGII. Entre os astrocitomas difusamente infiltrativos, porém, observa-se que a expressão deste gene aumenta gradualmente, com destaque nos casos de GBM (Figura 10). A análise estatística apontou diferença significativa exclusivamente entre o grupo de GBM e os demais grupos estudados.

Figura 10: Expressão de *LOX* em tecidos cerebrais não tumorais e em astrocitomas de diferentes graus de malignidade. As barras horizontais indicam as medianas de expressão de cada grupo. Teste de Dunn: *** $p < 0,0001$. NN: tecido cerebral não neoplásico; AGI: astrocitoma grau I; AGII: astrocitoma grau II; AGIII: astrocitoma grau III; GBM: glioblastoma.

A análise da expressão dos demais membros da família das lisil oxidases (*LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* e *LOXL4*) e também de *BMP1* e *HIF1A*, também mostrou um padrão de expressão com bastante dispersão em todos os graus de malignidade dos astrocitomas, conforme apresentado nas Figuras 11 e 12.

Figura 11: Expressão de *LOXL1*, *LOXL2* e *LOXL3*, em tecidos cerebrais não tumorais e em astrocitomas de diferentes graus de malignidade. As barras horizontais indicam as medianas de expressão de cada grupo. Teste de Dunn: ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. NN: tecido cerebral não neoplásico; AGI: astrocitoma grau I; AGII: astrocitoma grau II; AGIII: astrocitoma grau III; GBM: glioblastoma.

Figura 12: Expressão de *LOXL4*, *BMP1* e *HIF1A* em tecidos cerebrais não tumorais e em astrocitomas de diferentes graus de malignidade. As barras horizontais indicam as medianas de expressão absoluta de cada grupo. Teste de Dunn: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. NN: tecido cerebral não neoplásico; AGI: astrocitoma grau I; AGII: astrocitoma grau II; AGIII: astrocitoma grau III; GBM: glioblastoma.

Na Tabela 5 estão apresentados os dados de expressão de todos os genes analisados, com as medianas e valores mínimos e máximos de expressão de cada grupo.

Tabela 5: Valores das expressões absolutas dos genes analisados por PCR em tempo real

	NN	AGI	AGII	AGIII	GBM
<i>LOX</i>	0,03 (0,01-1,00)	0,09 (0,01-3,90)	0,04 (0,01-1,00)	0,07 (0,01-1,78)	1,42 (0,01-45,78)
<i>LOXL1</i>	0,04 (0,01-8,37)	0,26 (0,01-0,92)	0,03 (0,01-0,92)	0,07 (0,01-0,13)	0,37 (0,01-8,37)
<i>LOXL2</i>	0,04 (0,02-0,10)	0,79 (0,03-4,65)	0,11 (0,03-1,02)	0,27 (0,07-26,47)	1,46 (0,09-8,63)
<i>LOXL3</i>	0,41 (0,12-2,58)	2,50 (0,35-3,25)	0,97 (0,35-5,14)	2,14 (0,12-9,66)	2,28 (0,12-9,66)
<i>LOXL4</i>	0,01 (0,01-0,06)	0,02 (0,01-13,15)	0,01 (0,01-0,03)	0,01 (0,01-2,22)	0,02 (0,01-2,22)
<i>BMP1</i>	0,17 (0,02-2,42)	0,41 (0,02-1,19)	0,15 (0,02-0,87)	0,25 (0,04-2,42)	0,35 (0,04-2,42)
<i>HIF1A</i>	1,02 (0,37-2,70)	3,53 (0,60-6,90)	7,12 (0,86-40,18)	9,24 (2,84-22,86)	7,32 (0,53-53,62)

Os valores de expressão são demonstrados como mediana (menor e maior valor no grupo de amostras). NN: tecido cerebral não neoplásico; AGI: astrocitoma grau I; AGII: astrocitoma grau II; AGIII: astrocitoma grau III; GBM: glioblastoma.

A mediana da expressão de todos os genes analisados está aumentada nos grupos de GBM em relação aos tecidos NN. Interessantemente, há também um aumento na expressão dos casos de AGI quando comparados com os tecidos NN e também com o grupo de AGII em todos os genes da família de LOX. Entre os astrocitomas difusamente infiltrativos, observa-se que a expressão relativa de todos estes genes aumenta gradualmente com o grau de malignidade.

Com relação ao *BMP1*, não houve diferença significativa nos níveis de expressão nos casos de AGII e AGIII em relação aos tecidos NN. Entretanto, nos astrocitomas difusamente infiltrativos a expressão aumenta conforme aumenta o grau de malignidade. Além disto, o grupo de AGI apresentou maior expressão em relação ao grupo NN.

4.1.3. Correlações das expressões gênicas

Em seguida, foi realizada uma análise de correlação das expressões de todos os genes em cada grupo de astrocitomas (correlação de Spearman Rho) (Figura 13).

Nos astrocitomas grau I, observou-se uma correlação positiva moderada com valores estatisticamente significativos nos níveis de expressão de *LOX* com *LOXL4* ($p=0,037$ e $r=0,438$), *LOXL2* com *LOXL1* ($p=0,025$ e $r=0,467$) e *HIF1A* ($p=0,043$ e $r=0,426$) e *BMP1* com *HIF1A* ($p=0,033$ e $r=0,447$).

A correlação positiva de expressão nos astrocitomas grau II com valores estatísticos significativos foi observada entre *LOX* com *LOXL1* ($p=0,024$ e $r=0,440$) e com *LOXL2* ($p<0,0001$ e $r=0,680$), de *LOXL1* com *LOXL2* ($p=0,007$ e $r=0,514$) e *LOXL4* ($p=0,001$ e $r=0,610$), de *LOXL3* com *LOXL2* ($p=0,013$ e $r=0,479$) e com *HIF1A* ($p=0,014$ e $r=0,476$).

Nos astrocitomas grau III, a expressão de *LOX* correlacionou-se positivamente com significância estatística com as expressões de *LOXL1* ($p=0,002$ e $r=0,673$), de *LOXL2* ($p=0,002$ e $r=0,669$) e de *HIF1A* ($p=0,030$ e $r=0,511$). As expressões de *LOXL1*, por sua vez, apresentou correlação negativa com as de *HIF1A* ($p=0,028$ e $r=-0,517$).

Figura 13: Mapa de cores dos dados de correlações de Spearman rho dos valores de expressão dos genes *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3*, *LOXL4*, *BMP1* e *HIF1A* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade. Matriz de cores com os valores mais altos representados em vermelho e os mais baixos em azul. Em negrito estão destacados os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Nos GBMs, por sua vez, a expressão de *LOX* apresentou correlações positivas moderadas com significância estatística com as expressões de vários genes: de *LOXL1* ($p=0,001$ e $r=0,350$), de *LOXL2* ($p<0,0001$ e $r=0,512$), de *BMP1* ($p=0,045$ e $r=0,217$) e de *HIF1A* ($p=0,001$ e $r=0,367$). *LOXL1* apresentou correlação significativa nos níveis de expressão com *LOXL2* ($p<0,0001$ e $r=0,643$), com *LOXL3* ($p=0,011$ e $r=0,271$), com *LOXL4* ($p=0,036$ e $r=0,227$), com *BMP1* ($p<0,0001$ e $r=0,370$) e com *HIF1A* ($p=0,001$ e $r=0,343$). Os níveis de expressão de *LOXL2* se correlacionaram positiva e significativamente com os valores de expressão de *LOXL3* ($p<0,0001$ e $r=0,420$), *BMP1* ($p=0,001$ e $r=0,347$) e *HIF1A* ($p<0,0001$ e $r=0,448$). Os níveis de expressão de *LOXL3* se correlacionaram de forma significativa com os níveis de expressão com *LOXL4* ($p=0,009$ e $r=0,282$) e *BMP1* ($p<0,0001$ e $r=0,416$). *BMP1* apresentou níveis de expressão que se correlacionaram de forma positiva com os de *HIF1A* ($p<0,0001$ e $r=0,389$).

4.2. Análise de sobrevida

As curvas de Kaplan Meier de sobrevida dos pacientes com GBM foram analisadas de acordo com os níveis de expressão dos genes em estudo. Os casos foram divididos em dois grupos, com hipoexpressão e hiperexpressão, de acordo com as medianas dos valores de expressão. Não houve diferença estatisticamente significativa nas curvas de sobrevida dos pacientes com GBM quando analisados os dados de expressão de todos os genes (Figura 14), exceto *LOXL3*. Foi observada uma diminuição significativa de sobrevida dos pacientes de GBM com *LOXL3* hiperexpresso em relação aos com os casos com menores expressões (Figura 15). A sobrevida média dos pacientes com hiperexpressão de *LOXL3* foi de $9,45 \pm 1,82$ meses, enquanto que aqueles com expressão menor de *LOXL3* apresentaram uma sobrevida média de $15,0 \pm 2,30$ meses ($p=0,028$).

Figura 14: Curvas de sobrevida comparando pacientes com GBM com hiperexpressão (verde) e hipoexpressão (azul) dos genes *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL4*, *HIF1A* e *BMP1*.

Figura 15: Curva de sobrevivência comparando-se pacientes com GBM com hiper (verde) e hipoexpressão (azul) de LOXL3.

4.3. Associação entre as expressões gênicas e o status de mutação de IDH1

A frequência de mutação *IDH1* foi de 80,8% em AGII (21 em 26), 61,1% em AGIII (11 em 18) e 12,8% em GBM (11 em 86). Nossa casuística em GBM é composta principalmente por GBMs primários, o que explica a baixa frequência de mutação de *IDH1*.

Os casos de AGII com *IDH1* mutado apresentaram menor expressão de *LOXL1* e de *LOXL4* quando comparados com os casos AGII sem mutação no gene *IDH1* ($p=0,0270$ e $p=0,0437$, respectivamente).

Os casos de GBMs com mutação de *IDH1*, por sua vez, apresentaram menores níveis de expressão de *LOX* e de *LOXL1* ($p=0,0080$ e $p=0,0043$, respectivamente).

A Figura 16 apresenta a comparação dos dados de expressão dos diferentes genes analisados dos casos de astrocitomas difusamente infiltrativos (GII-GIV) com e sem mutação de *IDH1*.

Figura 16: Comparação dos níveis de expressão dos genes entre os casos com e sem mutação de *IDH1* nos astrocitomas difusamente infiltrativos. AGII: astrocitoma grau II; AGIII: astrocitoma grau III; GBM: glioblastoma. Teste de Mann-Whitney: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$.

4.4. Análise da expressão proteica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas para análise da expressão em nível de proteínas da família das lisil oxidases em tecidos cerebrais não tumorais e astrocitomas de diferentes graus de malignidade. Todas as marcações foram analisadas de uma forma semiquantitativa.

A expressão de LOX foi observada no citoplasma e no núcleo de todos os tecidos analisados com intensidades variadas (Figura 17). Embora no citoplasma não tenha dado diferença de marcação entre os astrocitomas, a marcação nuclear foi maior quanto maior o grau de malignidade dos tumores ($p=0,01$). Além disto, foi também observada expressão em células endoteliais, em vasos neoformados especificamente nos casos de GBMs, com diferença significativa ($p=0,0008$). Curiosamente, o caso de GBM com *IDH1* mutado, apresentou menor marcação nuclear de LOX, confirmando o resultado da análise de expressão gênica e o status de mutação de *IDH1*, apresentado na Figura 16. Em tecido cerebral normal, foi observada expressão de LOX principalmente nos núcleos de células gliais e neurônios.

LOXL1 apresentou um aumento de expressão nuclear conforme aumento do grau de malignidade, embora sem significância estatística ($p=0,35$). No citoplasma e no endotélio a marcação foi baixa em todos os grupos analisados (Figura 18).

Foi observada uma maior expressão de LOXL2 no núcleo ($p=0,005$) e no citoplasma nos casos de GBM (Figura 19).

Em relação ao LOXL3, observou-se diferença de marcação no citoplasma ($p=0,01$) e no endotélio ($p=0,01$), com maior expressão nos casos de GBM (Figura 20).

A expressão de LOXL4 foi observada em todas as amostras de tecido analisadas, tanto no núcleo ($p=0,0008$) quanto no citoplasma ($p=0,01$) e células endoteliais ($p=0,04$), embora os astrocitomas G1 tenham apresentado menor marcação (Figura 21).

Figura 17: Análise da imunomarcção de LOX em astrocitomas e tecidos cerebrais não-neoplásicos. (A) Fotomicroscopia ótica de imuno-histoquímica da expressão e da localização de LOX. As reações foram realizadas em seis casos de cada grupo de tecidos não-neoplásicos (NN), astrocitomas pilocítico (AGI), de astrocitomas de baixo grau (AGII), de astrocitomas anaplásicos (AGIII) e de glioblastomas (GBM). As setas indicam os endotélios marcados. Aumento 400x. (B) Análise semiquantitativa da marcação da imuno-histoquímica, obtida pelo produto da intensidade da coloração pela porcentagem de estruturas positivas marcadas com anti-LOX no núcleo, citoplasma e células endoteliais. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. A diferença na expressão da proteína entre os grupos foi estatisticamente significativa para a marcação nuclear ($p=0,01$) e marcação no endotélio ($p=0,0008$), segundo teste de Kruskal-Wallis.

Figura 19: Análise da imunomarcção de LOXL2 em astrocitomas e tecidos cerebrais não-neoplásicos. (A) Fotomicroscopia ótica de imuno-histoquímica da expressão e da localização de LOX. As reações foram realizadas em seis casos de cada grupo de tecidos não-neoplásicos (NN), astrocitomas pilocítico (AGI), de astrocitomas de baixo grau (AGII), de astrocitomas anaplásicos (AGIII) e de glioblastomas (GBM). Aumento 400x. (B) Análise semiquantitativa da marcação da imuno-histoquímica, obtida pelo produto da intensidade da coloração pelo a porcentagem de estruturas positivas marcadas com anti-LOXL2 no núcleo, citoplasma e células endoteliais. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. A diferença da expressão proteica entre os grupos apresentou significância estatística para marcação nuclear ($p=0,05$), segundo teste de Kruskal-Wallis.

Figura 20: Análise da imunomarcção de LOXL3 em astrocitomas e tecidos cerebrais não-neoplásicos. (A) Fotomicroscopia ótica de imuno-histoquímica da expressão e da localização de LOX. As reações foram realizadas em seis casos de cada grupo de tecidos não-neoplásicos (NN), astrocitomas pilocítico (AGI), de astrocitomas de baixo grau (AGII), de astrocitomas anaplásicos (AGIII) e de glioblastomas (GBM). Aumento 400x. (B) Análise semiquantitativa da marcação da imuno-histoquímica, obtida pelo produto da intensidade da coloração pel a porcentagem de estruturas positivas marcadas com anti-LOXL3 no núcleo, citoplasma e células endoteliais. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. A diferença da expressão proteica entre os grupos apresentou significância estatística para marcação no citoplasma ($p= 0,001$) e no endotélio ($p= 0,001$), segundo teste utilizado de Kruskal-Wallis.

Figura 21: Análise da imunomarcção de LOXL4 em astrocitomas e tecidos cerebrais não-neoplásicos. (A) Fotomicroscopia ótica de imuno-histoquímica da expressão e da localização de LOX. As reações foram realizadas em seis casos de cada grupo de tecidos não-neoplásicos (NN), astrocitomas pilocítico (AGI), de astrocitomas de baixo grau (AGII), de astrocitomas anaplásicos (AGIII) e de glioblastomas (GBM). Aumento 400x. (B) Análise semiquantitativa da marcação da imuno-histoquímica, obtida pelo produto da intensidade da coloração pelo a porcentagem de estruturas positivas marcadas com anti-LOXL1 no núcleo, citoplasma e células endoteliais. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. A diferença da expressão proteica entre os grupos apresentou significância estatística para marcação nuclear ($p=0,0008$), citoplasmática ($p=0,01$) e no endotélio ($p=0,01$), segundo teste de Kruskal-Wallis.

4.5. Ensaios funcionais

4.5.1. Silenciamento do gene *LOX*

O silenciamento de *LOX* foi realizado nas linhagens de GBM humano U87MG e A172 por transfecção com siRNA para o gene *LOX* e o controle NTC. Os dados de expressão de *LOX* em nível de gene, por qRT-PCR, e de proteína, por Western blotting, estão apresentados na Figura 22. Ambas as células apresentaram diminuição na expressão de *LOX* em relação ao controle NTC ao redor de 80% após 2 dias de transfecção.

Figura 22: Expressão de *LOX* em células U87MG e A172 após silenciamento com siRNA. As linhagens celulares U87MG e A172 foram transfectadas com siRNA de *LOX* e comparadas com o controle NTC. A expressão do gene foi determinada por qRT-PCR (A) e a expressão da proteína por Western blotting (B). Os dados mostram a média de dois experimentos independentes e a barra vertical representa o desvio padrão.

4.5.2. Efeito do silenciamento de *LOX* na proliferação celular

As células transfectadas foram mantidas em condições de cultura celular durante 2, 4 e 7 dias após a transfecção com a finalidade de se avaliar o envolvimento de *LOX* na proliferação das linhagens U87MG e A172. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na proliferação das células silenciadas para *LOX* em relação ao controle em ambas as linhagens analisadas. A Figura 23 apresenta os resultados obtidos para ambas as linhagens.

Figura 23: Efeito do silenciamento da expressão de *LOX* na proliferação celular nas células U87MG (A) e A172 (B). A curva de proliferação foi obtida pela contagem de células após 2, 4 e 7 dias após transfecção com siRNA de *LOX* e controle NTC. Os dados mostram a média de dois experimentos independentes e a barra vertical representa o desvio padrão.

4.5.3. Efeito do silenciamento e inibição de *LOX* na migração celular

Para testar a hipótese de que a expressão de *LOX* nas linhagens U87MG e na A172 esteja correlacionada com o aumento da capacidade migratória das células de GBM, as linhagens celulares foram avaliadas após 2 dias de silenciamento com siRNA de *LOX* e comparadas com células controle NTC. Observou-se uma redução da capacidade migratória das tanto da linhagem U87MG quanto da A172 silenciadas para expressão de *LOX*. A diferença de ambos os grupos foi estatisticamente significativa tanto para as células U87MG ($p < 0,001$) quanto para a linhagem A172 ($p < 0,0001$) (Figura 24). O efeito foi similar quando as células foram tratadas com o inibidor de *LOX*, BAPN, e comparadas com as células não tratadas ($p < 0,0001$ para ambas as linhagens) (Figura 24). Estes resultados reforçam o papel de *LOX* na migração de células de GBM.

4.5.4. Efeito do silenciamento de *LOX* na invasão celular

Observou-se, também, uma diminuição da capacidade de invasão das células U87MG e A172 quando silenciadas para expressão de *LOX*. A diferença foi estatisticamente significativa em relação às células controle tanto para a linhagem celular U87MG ($p < 0,0001$) quanto para a A172 ($p < 0,0001$) (Figura 25). Os dados corroboram os resultados de migração, mostrando que *LOX* é importante não só para o processo migratório, mas também para o invasivo das células de GBM.

Figura 24: Avaliação do comportamento migratório das células U87MG (A) e A172 (B) sem tratamento (parental), após transfecção com siRNA específico para LOX (siRNA LOX) ou controle (NTC) e tratadas com inibidor de LOX BAPN. Os gráficos representam a média do número de células que migraram por campo em cada condição (média $\pm$ desvio padrão) para dois experimentos independentes. As imagens apresentam campos representativos das células migratórias mostrando as células que atravessaram o inserto nas quatro condições, coradas com cristal violeta em aumento de 40x. Teste de Mann-Whitney: ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Figura 25: Avaliação do comportamento invasivo das células U87MG (A) e A172 (B) após silenciamento da expressão *LOX* com siRNA em relação ao controle NTC. Os gráficos representam a média do número de células que invadiram por campo em cada condição (média $\pm$ desvio padrão) para dois experimentos independentes. As imagens apresentam campos representativos das células migratórias mostrando as células que atravessaram o inserto nas duas condições, coradas com cristal violeta em aumento de 40x. Teste de Mann-Whitney: ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

4.5.5. Efeito do silenciamento de *LOX* no crescimento independente de ancoragem

A influência da expressão de *LOX* nas linhagens de GBM foi também avaliada através de ensaio de crescimento em suspensão de agarose somente para U87MG após transfecção com siRNA de *LOX* e controle NTC. O ensaio de crescimento em suspensão de agarose ou independente de ancoragem é o experimento *in vitro* que mostra a capacidade tumorigênica das células em cultura. Não houve diferença no número de colônias das células U87MG silenciadas para a expressão de *LOX* com relação ao NTC ($p=0,435$) (Figura 26A). Por outro lado, houve uma diminuição no número de colônias das células A172 em relação ao NTC (Figura 26B), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), mostrando também um papel importante de *LOX* na habilidade das células de GBM crescerem independentemente de ancoragem *in vitro*.

Figura 26: Avaliação do crescimento independente de ancoragem das células U87MG (A) e A172 (B) após silenciamento da expressão *LOX* com siRNA em relação ao controle NTC. Os gráficos representam a média do número de colônias por poço em cada condição (média $\pm$ desvio padrão) para dois experimentos independentes. Teste de Mann-Whitney: *** $p < 0,0001$.

6 *DISCUSSÃO*

O gene *LOX* e demais membros da família das lisil oxidases (*LOXL1* a *4*) codificam proteínas cujas funções já foram estudadas em diversos tipos de tumores. A ação destes na regulação da rigidez da MEC através da formação de ligações cruzadas do colágeno e da elastina é bem estabelecida, embora funções intracelulares e nucleares já tenham sido relatadas. A expressão de *LOX* e a atividade da enzima propriamente dita já foram associadas a processos vitais para a tumorigênese e progressão tumoral, especialmente à invasão celular e formação de metástases. A expressão de membros da família das lisil oxidases é firmemente controlada durante o desenvolvimento normal. No entanto, alterações na expressão e na atividade destas proteínas foram relatadas em vários tipos de doenças, bem como em muitos tipos de tumor e estão predominantemente associados com a MEC. No presente trabalho, investigamos a expressão gênica e proteica dos membros da família das lisil oxidases bem como a expressão dos genes *BMP1*, *HIF1A* e o status de mutação de *IDH1* em diferentes graus de astrocitomas. Além disto, o comportamento na migração, invasão, proliferação e crescimento independente de ancoragem de duas linhagens celulares de GBM após o silenciamento de *LOX* foi avaliado.

5.1. Expressão gênica da família das lisil oxidases *BMP1* e *HIF1A* em astrocitomas

LOX apresentou um aumento dos níveis de expressão com o aumento do grau de malignidade dos astrocitomas difusamente infiltrativos, especialmente os GBMs, quando comparados às amostras de tecido cerebral não neoplásico. Disfunções nesse gene levam a redução nas interligações das fibras, sugerindo a participação da enzima o processo de maturação e estabilização das fibras. Essas disfunções podem levar a tumorigênese e progressão tumoral, especialmente devido à invasão celular e formação de metástases. A maioria dos estudos de *LOX* foi realizada em tumores de mama, cabeça e pescoço, pulmão, colorretal, pâncreas, osteosarcoma e estômago (Le et al., 2009; Gao et al., 2010; Min et al., 2010; Lee et al., 2011; Sanchez et al., 2011; Bais et al., 2012; Eiseler et al., 2012; Ji et al., 2013; Xu et al., 2013; Zhang 2013, Kim et al., 2014).

Há apenas um trabalho na literatura sobre *LOX* em astrocitomas (Lackzo et al., 2007).

Semelhante a *LOX*, os níveis de expressão dos outros membros da família das lisil oxidases também aumentaram com o aumento do grau de malignidade dos astrocitomas difusamente infiltrativos quando comparados aos controles de tecido cerebral não-neoplásico, principalmente em casos de GBM. Dados de aumento de expressão já foram descrito em outros tipos de tumores (Sakai et al., 2009; Albinger-Hegyi et al., 2010; Baker et al., 2011; Chen et al., 2012; Ping et al., 2013).

Além disto, os níveis de expressão observados para *HIF1A* e *BMP1*, que codificam HIF-1 α e a principal enzima que ativa *LOX* e *LOXL1*, também foram maiores nos casos de GBM. As correlações positivas de coexpressão foram também maiores neste grupo de astrocitomas. Estes achados podem ser explicados primeiramente pelo fato do número de amostras ser bem maior do que os dos outros grupos, por se tratar do tumor mais frequente do SNC. Outra explicação é o fato dos GBMs serem os astrocitomas mais malignos e invasivos, com alta capacidade proliferativa. Todas estas características levam ao desenvolvimento de áreas de hipóxia e consequentemente, necrose. A redução da disponibilidade de oxigênio ativa HIF-1 α que, por sua vez, ativa a transcrição de vários genes alvos, incluindo *LOX*, *LOXL2* e *LOXL4* (Erler et al., 2006; Schietke et al., 2010; Wong et al., 2011), ativando tanto vias angiogênicas, quanto de migração e invasão dos astrocitomas difusamente infiltrativos (Erler et al., 2006; Lee et al., 2006). Estas propriedades migratórias e invasivas são ativadas pela sinalização da via FAK/Src, como já descrito para células de astrocitomas (Laczko et al., 2007). Além disto, *LOX* também regula positivamente a expressão de HIF-1 α em um mecanismo sinérgico de adaptação do tumor à hipóxia (Cassavaugh & Lounsbury, 2011), via ativação da sinalização PI3K/Akt, levando a um aumento da proliferação (Pez et al., 2011). Estes mecanismos levam à progressão tumoral e já foi descrita em diversos tipos de neoplasias, como mama, cabeça e pescoço, próstata, carcinomas de células renais e câncer cervical (Semenza & Wang, 1992; Wang et al., 1995; Carmeliet et al., 1998; Harris, 2001; Erler et al., 2006; Erler et al., 2009; Allen et al., 2011; Yang et al., 2013).

Por outro lado, BMP1 é capaz de clivar e liberar o domínio catalítico de LOX e LOXL1 (Lucero & Kagan, 2006) e, deste modo, contribui para maior rigidez da MEC e potencializa a capacidade migratória e invasiva das células tumorais. Vale ainda ressaltar que BMP1 pode ativar vários outros substratos que são também importantes reguladores da produção e qualidade de componentes da MEC (Bond et al., 1995; Kessler et al., 1996; Sterchi et al., 2008; Ge et al., 2006).

Interessantemente, as medianas de expressão dos genes de toda a família das lisil oxidases, além de BMP1, foram maiores nas amostras de AGI do que nas de AGII. Em oposição, *HIF1A* foi o único dos genes analisados que não apresentou este perfil de expressão, embora sua expressão mediana seja maior do que a do grupo controle. AGI é considerado um astrocitoma não invasivo, enquanto que os AGII são infiltrativos. Além disto, AGI apresenta proliferação vascular e apresenta maior contraste em neuroimagem quando comparado ao AGII. A expressão de HIF-1 α já foi descrita em AGI, com ativação da via angiogênica regulada pela hipóxia (Mustafa et al., 2013).

O aumento da expressão de *LOXL2* já foi descrito em diferentes tipos de tumores e foi correlacionado com fatores ruins de prognóstico, como malignidade no tumor de cólon (Fong et al., 2007) e de mama (Peinado et al., 2008; Barry-Hamilton et al., 2010; Barker et al., 2011; Moreno-Bueno et al., 2011; Akiri et al., 2003), progressão de câncer de pulmão (Zhan et al., 2012), além de metástase linfática e menor tempo de sobrevivência de pacientes com tumores gástricos e esofágicos (Peinado et al., 2008; Peng et al., 2008; Li et al., 2012). Não há descrição da análise de expressão de *LOXL2* em astrocitomas, mas seu papel deve ser importante, uma vez que apresenta mecanismo de ação semelhante ao de LOX na invasão e metástase, via ativação da via FAK/Src (Peng et al., 2009; Canesin et al., 2014; Cuevas et al., 2014). Além disto, *LOXL2* é também regulado por HIF-1 α (Schietke et al., 2010) e promove a angiogênese (Zaffrany-Eilot et al., 2013).

Não há dados de análise de expressão de *LOXL4* em astrocitomas. Embora a expressão tenha sido maior no grupo de GBMs, os níveis de expressão no geral foram os mais baixos entre todos os genes analisados,

sugerindo um papel menos relevante nestes tumores, embora seja também regulado pela hipóxia e promova o remodelamento da MEC (Wong et al., 2011).

A análise da correlação da expressão de *LOXL3* com a sobrevida dos pacientes com GBM mostrou que houve uma diminuição do tempo de sobrevida dos pacientes com a maior expressão de *LOXL3* ($15,00 \pm 2,30$ meses) em relação aos pacientes com o gene menos expresso ($9,45 \pm 1,82$ meses). Os dados referentes a este membro da família das lisil oxidases em tumores são bastante escassos, e maiores investigações sobre o papel que desempenha não só em astrocitomas, mas em outros tipos de tumores, ainda são necessários, para explicar o impacto na sobrevida dos pacientes. Devido à homologia que apresenta com *LOXL2* e *LOXL4*, possui ação de amino oxidase sobre diversos componentes da MEC, além de ser inibido por BAPN, indicando que desempenha uma diversidade de funções nos tumores como os demais membros.

5.2. Correlação da expressão dos genes da família das lisil oxidases, *BMP1* e *HIF1A* com o status de mutação de *IDH1*

A mutação de *IDH1* R132H foi detectada em 80,8% dos casos de AGII, 61,1% de AGIII e 12,8% de GBM. Nossa casuística em GBM é composta principalmente por casos primários, o que explica a baixa frequência de mutação de *IDH1* (Uno et al., 2011).

Uma lista de genes com baixa expressão responsivos a HIF-1 α , incluindo *LOX*, foi recentemente relatado em gliomas e células-tronco tumorais com *IDH1* mutado (Chesnelong et al., 2014). 2HG, produzido pela enzima mutada, inibe PHD, responsável pela hidroxilação e degradação de HIF-1 α (Frezza et al., 2010). Consequentemente, HIF-1 α é translocado para o núcleo e ativa a expressão de vários genes. Isto explica os dados de expressão de *HIF1A*, que mostram que a mutação de *IDH1* não teve impacto na sua expressão. A expressão não é aumentada, mas a proteína é estabilizada. Outros estudos têm demonstrado que os pacientes com *IDH1* mutado não é suficiente para aumentar a expressão de *HIF1A* (Willians et al., 2011).

Por outro lado, os casos GBMs com *IDH1* mutado apresentaram *LOX* e *LOXL1* com menor expressão do que os casos sem mutação. *LOXL1* e *LOXL4*

também apresentaram menor expressão nas amostras de AGII com a mutação de *IDH1*. A mutação de *IDH1* é uma característica comum em gliomas de baixo grau e GBMs secundários (Ichimura et al, 2009; Yan et al, 2009; Parsons et al, 2008, Nobusawa et al, 2009). A presença desta mutação está fortemente correlacionada com um fenótipo “metilador” das ilhas CpG em gliomas (Noushmehr et al., 2010); portanto, metilação das regiões promotoras poderia explicar a diminuição da expressão destes genes na presença da mutação (Zhang et al., 2013). A inativação de *LOX* por metilação já foi demonstrada em câncer gástrico, de cólon, de pulmão e em linhagens celulares de câncer de ovário (Kaneda et al., 2004).

5.3. Expressão proteica dos membros da família das lisil oxidases em astrocitomas

Os resultados de imuno-histoquímica revelaram a expressão das proteínas que fazem parte da família das lisil oxidases no núcleo e no citoplasma das células tumorais, com maior marcação por imuno-histoquímica dos GBMs, confirmando os dados de expressão gênica.

Foi descrita uma intensa marcação de *LOX* perinuclear e citoplasmática em astrocitomas de diferentes graus de malignidade, a embora a localização nuclear não tenha sido citada (Laczko et al., 2007). Interessantemente, a expressão de *LOX* foi também observada nas amostras não neoplásicas, com marcação das células gliais e neuronais. Li et al. (2004) também demonstraram localização de *LOX* no citoplasma de neurônios de rato e camundongo.

Localização nuclear de *LOX* também já foi descrita em músculo liso (Li et al., 1997; Nellaiappan et al., 2000) e células em proliferação (Saad et al., 2010). *LOX* pode oxidar proteínas nucleares, como a histona H1 (Kagan et al., 2003), levando a efeitos epigenéticos em interações DNA-histona e histona-histona, com os consequentes alteração da transcrição do DNA em analogia aos efeitos resultantes da acetilação das histonas (El-Osta & Wolff 2000).

Nossos achados estão de acordo os dados de outros estudos de imuno-histoquímica, como câncer de mama (Chen et al., 2012) e de pulmão (Ping et al., 2013), carcinoma de células escamosas da orofaringe (Albinger-Hegyí et al., 2009) e do esôfago (Sakai et al, 2009), carcinoma colorretal (Baker et al., 2011;

Pez et al., 2011; Ward et al., 2014) e melanoma (Abourbih et al., 2010), nos quais os autores demonstraram que alta expressão de LOX correlaciona-se com o grau de malignidade e/ou metástase. Além disto, a marcação citoplasmática é um achado comum na maioria destes estudos.

A marcação de LOXL1 no geral foi baixa, com pequeno aumento para a expressão no núcleo dos casos de GBM. A função dessa proteína ainda não é bem conhecida. Há somente um relato de que LOXL1 desempenhe um papel de gene supressor de tumor em câncer de bexiga (Wu et al., 2007).

Foi observada expressão predominantemente nuclear de LOXL2, com baixa expressão no citoplasma, nos astrocitomas de maior grau de malignidade. Em uma análise imuno-histoquímica de carcinoma de esôfago, a presença de LOXL2 no núcleo estava diminuída, com aumento da expressão citoplasmática em relação à expressão em tecido esofágico normal, além de ter um impacto negativo na sobrevida dos pacientes (Li et al., 2013). O aumento de LOXL2 no citoplasma pode contribuir para a invasão e metástase de câncer gástrico e de mama (Peng et al., 2009; Hollosi et al., 2009). Trabalhos mostraram que a proteína LOXL2 está com a expressão aumentada em vários tipos de câncer, incluindo de estômago, cólon, mama; carcinoma de células escamosas, e se correlaciona com o grau de malignidade desses tumores (Fong et al., 2007; Peinado et al., 2008; Moreno et al., 2011).

LOXL3 apresentou a localização nuclear e citoplasmática nos GBMs. Não há muitos trabalhos publicados referentes à proteína LOXL3. Em tumores das cavidades serosas LOXL3, sua expressão estava relacionada com o crescimento do tumor nos sítios primários e metastáticos (Sebban et al., 2009).

LOXL4, por sua vez, apresentou alta expressão nuclear, citoplasmática e no endotélio de todos os grupos analisados, com menor expressão nos AGI. Tanto as marcações nucleares quanto citoplasmática apresentaram diferença significativa. Nossos achados estão de acordo com os relatados por Jiang et al. (2013), no qual os autores demonstraram uma intensa marcação no citoplasma em tumores odontogênicos ceratocísticos, levando à hipótese da participação de LOXL4 na angiogênese. Uma alta expressão da proteína LOXL4 em células de carcinoma de cabeça e pescoço se correlacionou com metástase (Gorogh et al., 2007). Além disto, estes mesmos autores mostraram que a localização nuclear

de LOXL4, nos núcleos de linhagens celulares se correlacionou com aumento do número de cópias dos genes *LOXL4*.

Nossos resultados sugerem que os membros da família das lisil oxidases desempenham papéis importantes e variados em astrocitomas, reforçando a necessidade de maiores estudos funcionais para cada um dos membros. Estes dados, em conjunto com a mutação de *IDH1* em astrocitomas, podem fornecer novas perspectivas ao projetar terapias direcionadas para o controle destes tumores.

5.4. Análise funcional de LOX em astrocitomas *in vitro*

A ação de LOX é essencial para a formação de ligações covalentes em componentes da MEC também em astrocitomas (Laczko et al., 2007). Níveis elevados de LOX modificam a MEC agindo diretamente sobre o colágeno, possibilitando as ligações cruzadas, contribuindo para a ativação mediada por peróxido de hidrogênio do complexo FAK/paxilina estimulando o comportamento migratório e invasivo dessas células. Estes dados foram corroborados pelos dados funcionais realizados com as linhagens U87MG e A172, as quais, após transfectadas com siRNA de *LOX*, tiveram um menor comportamento migratório, invasivo e capacidade de crescimento independente de ancoragem. Ensaio sobre o envolvimento de *LOX* na proliferação das linhagens U87MG e A172 não mostraram diferença na alteração da proliferação nas células silenciadas para *LOX* em relação ao controle em ambas as células analisadas.

Este dado corrobora com o trabalho de Polgar et al. (2007) em células de câncer de mama MCF-10, no qual *LOX*, juntamente com hormônio lactogênio placentário (PL), aumentou significativamente a proliferação das células enquanto somente *LOX* não teve nenhum efeito na proliferação dessas células, o que sugere uma relação funcional entre essas proteínas. Nas células de câncer de pulmão, só houve uma diferença na proliferação quando as células foram tratadas com BAPN (Gao et al., 2010). Em contraste, células de câncer colorretal, silenciadas para a expressão de *LOX*, apresentam uma diminuição na proliferação (Baker et al., 2011).

No presente estudo, a expressão de *LOX* desempenhou importante papel no comportamento migratório e invasivo das linhagens celulares U87MG e A172.

O silenciamento de *LOX* com siRNA ou a inibição com BAPN levaram a uma redução de ambas as células migrarem e invadirem. Estes resultados foram similares foram aos obtidos por Laczko et al. (2007) em outras duas linhagens de GBM U251 e U373 tratadas com BAPN e catalase. O excesso de H_2O_2 intracelular facilita a fosforilação e ativação de Src, que por sua vez fosforila FAK, resultando na indução de várias vias de sinalização envolvidas na regulação da adesão e migração celular (Basuroy et al., 2010). Dados similares do modo de ação de *LOX* foram encontrados em células de câncer de mama, colorretal e ovário (Payne et al., 2005; Chen et al., 2012; Baker et al., 2013, Ji et al., 2013), Todos estes resultados corroboram a importância de *LOX* nas propriedades de migrar e invadir das células tumorais.

BAPN é um inibidor irreversível *LOX* e outros membros da família, e foi utilizado inicialmente para tratamento de hipertensão (Sheridan et al., 1979), diminuição da cicatrização de feridas (Arem et al., 1975), e quimiotaxia de células mononucleares do sangue periférico (Lazarus et al., 1995), prevenindo a formação de colágeno vascular com muitas ligações cruzadas. Posteriormente, o uso desta droga foi proposto para o tratamento dos tumores com alta expressão de *LOX*, como melanoma (Abourbih et al., 2010; Osawa et al., 2013), carcinoma de cabeça e pescoço (Shih et al., 2012; Yang et al., 2013) e de mama (Bondareva et al., 2009; Chen et al., 2012). Recentemente foi utilizado no tratamento de modelos *in vivo* de tumores de pâncreas (Wiel et al., 2013) e de GBM (Mommoto et al., 2013). Outros inibidores também inespecíficos, como magnolol e D-penicilamina, foram também testados em modelo animais de câncer de mama (Chen et al., 2012) e de GBM (Mommoto et al., 2013). Todos estes resultados mostram que as proteínas da família das lisil oxidases podem ser alvos no tratamento de tumores.

Os resultados referentes ao ensaio de crescimento em suspensão de agarose mostraram que houve uma diminuição no número de colônias somente das células A172 após silenciamento da expressão de *LOX*. Resultados semelhante foram encontrados em células de câncer de mama transfectadas com siRNA de *LOX* ou tratadas com inibidores de *LOX*. A capacidade de formação de colônias foi profundamente afetada quando comparada com o

controle, sugerindo o envolvimento da via FAK neste processo (Cheng et al., 2012).

Os membros da família das lisil oxidases parecem desempenhar múltiplos papéis que afetam tanto funções extras como intracelulares. A maioria dos estudos visa apenas à atividade catalítica destas proteínas como alvos terapêuticos através da utilização de inibidores competitivos irreversíveis, como BAPN (visando os domínios catalíticos) ou anticorpos específicos de bloqueio de funções (visando ambos os domínios catalíticos e não catalíticos). No entanto, os membros da família das lisil oxidases podem interagir com outras proteínas através de vários domínios para coordenar diversificada funções biológicas.

6 CONCLUSÕES

1. As expressões dos genes *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3*, *LOXL4*, *BMP1* e *HIF1A* aumentam com o aumento de malignidade dos astrocitomas difusamente infiltrativos, indicando que possivelmente os membros da família das lisil oxidases influenciam vias ou processos importantes no processo de malignização;
2. Os genes analisados se correlacionaram positivamente nos astrocitomas de diferentes graus em níveis diferentes, principalmente nos GBMs, confirmando que há uma coexpressão entre eles;
3. O nível de expressão de *LOXL3* impactou na sobrevida dos pacientes com GBM, quanto maior sua expressão, menor foi o tempo de sobrevida total dos pacientes;
4. Os casos de AGII que apresentaram *IDH1* mutado apresentaram menores níveis de expressão de *LOXL1* e *LOXL4* quando comparados com os casos sem mutação. Já os GBMs, os casos com mutação de *IDH1* apresentaram menores níveis de expressão de *LOX* e *LOXL1* quando comparados com os casos nos quais a mutação não foi detectada;
5. A expressão proteica dos membros da família das lisil oxidases aumenta com o grau de malignidade dos astrocitomas. A localização da proteína é preferencialmente no núcleo e citoplasma, observando-se também uma marcação de *LOX* no endotélio nos casos de GBM;
6. Os estudos funcionais mostraram que *LOX* está envolvido em processos importantes tumorais dos GBMs *in vitro*. A expressão e a atividade de *LOX* foram correlacionadas com a capacidade migratória das linhagens U87MG e A172. A menor expressão de *LOX* levou a uma diminuição da capacidade invasiva e de crescimento independente de ancoragem celular.

7 ANEXOS

7.1. Anexo 1: Aprovação do projeto pela CAPPesq

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

Ao

Departamento de Neurologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão de 08.08.12 a execução do subprojeto intitulado "**Expressão e papel dos genes da família lisil oxidases em astrocitomas**" que será tese de Doutorado do aluno **Roseli da Silva**, tendo como orientadora **Dra. Sueli Mieko Oba Shinjo**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0600/10**, intitulado "**Estudo de genes envolvidos nas vias Sonic Hedgehog, Wnt e Notch em meduloblastomas: correlação Cclínico-Mmolecular.**" tendo como Responsável a **Dra. Sueli Kazue Nagahashi Marie**

CAPPesq, 13 de Agosto de 2012.

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

7.2. Anexo 2: Informações e dados clínicos dos pacientes incluídos nesse trabalho

Diagnóstico	Caso	Número	AS3	Nome	Sexo	Idade*	No. do Anátomo Patológico	Data de Nascimento	Data de Cirurgia	Data de Óbito	Tempo de Seguimento*	Sobrevida (meses)
NN	1	108	N	MMP	M	31a	48-6846-3	08/05/70	28/06/01		7a 8m	
NN	2	132	N	EOA	M	51a	49-5770-9	10/11/49	16/08/01		7a 4m	
NN	3	167	N	EA	M	39a	50-4808-7	31/03/62	17/10/01		7a 4m	
NN	4	173	N	MIM	F	44a	50-5645-4	04/10/57	24/10/01		7a 4m	
NN	5	179	N	ED	F	39a		21/03/62	31/10/01		7a 4m	
NN	6	189	N	RLG	F	35a		15/06/66	21/11/01		7a 3m	
NN	7	196	N	IG	F	44a		15/08/57	05/12/01		7a 2m	
NN	8	226	N	PST	M	38a	51-7832-0	25/06/63	31/01/2002		7a 1m	
NN	9	232	N	FPB	M	28a		08/10/73	14/02/2002		7a 0m	
NN	10	237	N	AML	F	47a	52-0316-3	08/09/54	20/02/02		7a 0m	
NN	11	245	N	GVA	M	25a	52-1343-6	25/06/76	28/02/02		7a 0m	
NN	12	263	N	MML	M	27a		10/12/74	04/04/02		6a 10m	
NN	13	312	N	MCL	F	41a	53-6502-3	18/05/61	13/06/02		6a 8m	
NN	14	330	N	JMR	M	32a	54-1685-0	14/02/70	23/07/02		6a 7m	
NN	15	332	N	MSM	F	32a	54-2198-5	07/03/79	25/07/02		6a 7m	
NN	16	349	N	AGCC	M	40a	54-5969-9	26/12/61	21/08/02		6a 6m	
NN	17	714	N	VLPM	F	56a	62-2613-2	04/06/47	18/03/04		5a 10m	
NN	18	714	N	VLPM	F	56a	62-2100-9	04/06/47	18/03/04		4a 11m	
NN	19	755	N	SVSB	F	39a	63-0783-3	14/07/64	19/05/04		4a 9m	
NN	20	805	N	SAD	F	37a	64-1342-0	14/10/66	04/08/04		4a 6m	
NN	21	861	N	RM	M	35a	65-3324-8	01/04/69	03/11/04		4a 3m	
AGI	22	969	N	GC	F	34a		28/02/71	05/05/05		3a 9m	
AGI	23	185	N	APF	M	24a	50-8257-9	11/10/77	12/11/01		7a 3m	
AGI	24	335	N	MI	F	34a	54-2626-0	15/11/67	30/07/02		6a 7m	
AGI	25	352	N	JRS	M	35a	54-6383-1	28/09/66	23/08/02		6a 6m	
AGI	26	363	N	RFCO	M	13a	54-9952-6	20/04/89	18/09/02		6a 5m	
AGI	27	421	N	IAPV	F	16a	56-4821-1	09/03/86	15/01/03		6a 1m	
AGI	28	436	N	WGG	M	18a	56-8949-0	09/01/85	10/02/03		6a 0m	
AGI	29	463	N	SEM	F	16a	57-3638-2	07/07/86	21/03/03		5a 11m	
AGI	30	495	N	ASJM	F	8a	58-1515-0	16/10/94	21/05/03		5a 9m	
AGI	31	501	N	RJB	M	32a	58-2590-3	18/03/71	28/05/03		5a 9m	
AGI	32	570	N	KBRP	F	8a	59-5895-4	05/04/95	01/09/03		6a 1m	

Diagnóstico	Caso	Número	AS3	Nome	Sexo	Idade*	No. do Anátomo Patológico	Data de Nascimento	Data de Cirurgia	Data de Óbito	Tempo de Seguimento*	Sobrevida (meses)
AGI	33	594	N	JCFS	M	18a	59-9510-8	13/06/85	24/09/03		5a 5m	
AGI	34	601	N	JJS	M	21a	60-0984-0	26/07/82	06/10/03		5a 4m	
AGI	35	828	N	WHO	M	16a	64-8111-6	21/06/88	23/09/04		4a 5m	
AGI	36	878	N	JBS	F	18a	65-6608-1	02/11/86	29/11/04		4a 3m	
AGI	37	889	N	WAD	F	43a	65-9211-2	27/05/61	17/12/04		4a 2m	
AGI	38	892	N	RAR	M	14a	65-9601-0	01/01/90	22/12/04		4a 2m	
AGI	39	932	N	JSO	M	17a	66-7407-0	13/04/87	07/03/05		3a 11m	
AGI	40	946	N	PRTS	M	9a	66-9467-5	06/11/95	23/03/05		3a 11m	
AGI	41	995	N	JTAN	M	22a	68-3495-7	14/01/83	02/07/05		3a 8m	
AGI	42	1000	N	DSS	M	4a	68-4796-0	10/09/00	13/07/05		3a 7m	
AGI	43	1044	N	LRR	M	8a	69-6825-2	28/10/96	05/10/05		3a 4m	
AGI	44	1049	N	AOS	F	14a	69-8645-5	18/09/91	19/10/05		3a 4m	
AGI	45	1058	N	RLS	M	22a	70-0849-0	07/02/83	04/11/05		3a 3m	
AGII	46	55	89	MAP	F	36a	46-6343-8	21/03/64	02/01/01		8a 2m	114
AGII	47	76	14	ML	M	27a	47-3260-0	04/12/73	23/3/01	04/12/05		56
AGII	48	101	10	JNO	F	23a	48-3300-7	25/10/77	04/06/01		7a 8m	82
AGII	49	118	2	AMC	F	45a	49-1687-5	02/08/55	23/07/01	30/07/03		24
AGII	50	239	40	JRA	M	56a	52-0559-0	25/07/45	22/02/02		7a 0m	91
AGII	51	250	39	MBC	F	30a	52-2827-1	25/08/71	11/03/02		6a 11m	7
AGII	52	254	38	MGSJ	F	24a	52-3726-2	18/06/77	15/03/02		6a 11m	27
AGII	53	267	1	AMM	M	43a	52-7365-0	13/09/58	01/04/02		6a 10m	96
AGII	54	328	15	CHR	M	39a	54-0842-3	18/04/63	17/07/02		6a 7m	91
AGII	55	341	14	ML	M	28a	54-4295-8	04/12/73	09/08/02	04/12/05		
AGII	56	346	16	RTP	M	23a	54-5126-4	03/06/79	15/08/02		6a 6m	51
AGII	57	392	22	ARVA	F	38a	55-7686-5	09/05/64	11/11/02		6a 3m	80
AGII	58	412	1	AMM	M	44a	56-2912-8	13/09/58	20/12/02		6a 2m	
AGII	59	452	62	MRS	M	41a	57-1922-4	15/11/61	10/03/03	06/08/08	5a 11m	84
AGII	60	453	60	JOJ	M	28a	57-1958-5	23/12/74	11/03/03		5a 11m	44
AGII	61	467	63	MAM	F	41a	57-4432-6	25/10/61	27/03/03	06/09/06		41
AGII	62	490	52	NNS	M	35a	58-0272-5	20/06/67	13/05/03	01/08/06		38
AGII	63	577	78	RNN	F	35a	59-6637-0	08/10/67	05/09/03		5a 5m	50
AGII	64	715	88	AOE	F	27a	62-2613-2	26/10/76	22/03/04	10/01/05		9
AGII	65	806	93	ESM	M	39a	64-1370-6	08/02/65	05/08/04		4a 6m	44

Diagnóstico	Caso	Número	AS3	Nome	Sexo	Idade*	No. do Anátomo Patológico	Data de Nascimento	Data de Cirurgia	Data de Óbito	Tempo de Seguimento*	Sobrevida (meses)
AGII	66	999	115	JWMS	M	25a	68-4581-1	19/08/79	12/07/05		3a 7m	60
AGII	67	1016	119	ES	M	35a	68-7346-4	12/08/69	21/10/03		1a 11m	23
AGII	68	1095	127	JPS	M	32a	71-3078-3	08/12/73	10/02/06		3a 0m	110
AGII	69	1099	129	MGSA	F	32a	71-4215-3	06/03/73	17/02/06		4a 4m	52
AGII	70	1113	62	MRS	M	44a	71-9661-0	15/11/61	27/03/06	06/08/08		
AGII	71	1155	140	JSA	F	25a	2006-1830	13/07/81	14/07/06			43
AGIII	72	28	6	GAB	M	54a	45-5543-0	06/09/82	20/11/00		8a 3m	99
AGIII	73	34	53	MGCJ	M	18a	45-7850-3	06/09/82	20/11/00		8a 3m	115
AGIII	74	73	51	MCV	F	25a	47-2162-4	08/04/76	16/3/01	19/03/07		77
AGIII	75	233	41	OAA	F	58a	51-9554-3	12/07/43	15/02/2002	16/03/03		13
AGIII	76	249	3	AC	M	32a	52-2586-8	27/12/69	08/03/02	21/10/02		7
AGIII	77	338	11	LKH	F	37a	54-3528-5	21/01/65	05/08/02	14/10/03		14
AGIII	78	347	17	WCS	M	15a	54-5552-9	20/04/87	19/08/02		6a 6m	82
AGIII	79	360	18	ICVK	F	32a	54-9361-7	04/07/70	13/09/02		6a 5m	90
AGIII	80	366	8	GPJ	M	37a	55-0872-0	25/08/65	23/09/02		6a 5m	93
AGIII	81	410	67	AAS	M	30a	56-2773-7	04/08/73	19/12/02		6a 2m	77
AGIII	82	428	92	FCRN	M	58a	56-6174-9	04/10/80	24/01/03		6a 1m	74
AGIII	83	478	64	ASM	M	39a	57-6718-0	12/11/66	11/04/03	12/01/05		21
AGIII	84	514	73	LFF	M	37a	58-5446-6	10/11/65	16/06/03		5a 8m	24
AGIII	85	734	100	JRS	M	31a	62-7221-5	14/07/72	27/04/04		4a 10m	1
AGIII	86	905	38	MG SJ	F	27a	66-1379-9	18/06/77	14/01/05		4a 1m	1
AGIII	87	981	N	VGCJ	M	21a	67-8719-3	08/02/84	01/06/05		3a 9m	
AGIII	88	1033	121	ANS	F	29a	69-3015-8	02/06/76	08/09/05		3a 5m	2
AGIII	89	1036	120	MDDT	F	46a	69-3029-8	19/07/59	10/09/05	12/12/05		3
GBM	90	35	12	MPS	M	53a	45-7850-3	25/11/47	24/11/00	15/09/04		45
GBM	91	74	50	UC	M	74a	47-2426-7	25/10/26	19/3/01	29/08/02		17
GBM	92	175	49	MTC	F	56a	50-6045-1	07/04/45	26/10/01	31/03/02		5
GBM	93	194	48	OB	M	71a	51-0694-0	29/05/30	30/11/01	01/10/03		22
GBM	94	204	47	BL	F	70a	51-3734-9	01/01/30	21/12/01	06/08/02		7
GBM	95	208	45	EFC	M	62a	51-4351-9	09/08/39	04/01/02	24/07/02		6
GBM	96	256	7	CDS	M	41a	52-4509-5	25/11/60	21/03/02	14/06/02		2
GBM	97	269	43	ELAD	F	65a	52-7569-5	28/02/37	12/04/02	18/04/02		0
GBM	98	274	42	BCJ	F	47a	52-8714-6	20/12/54	19/04/02	27/09/03		17

Diagnóstico	Caso	Número	AS3	Nome	Sexo	Idade*	No. do Anátomo Patológico	Data de Nascimento	Data de Cirurgia	Data de Óbito	Tempo de Seguimento*	Sobrevida (meses)
GBM	99	297	4	MCE	F	78a	53-3674-0	14/06/23	23/05/02	02/05/03		11
GBM	100	317	32	MJO	F	71a	53-7898-2	22/12/30	24/06/02	15/09/02		2
GBM	101	356	30	JS	M	74a	54-7434-5	17/06/28	30/08/02	23/08/03		11
GBM	102	370	29	WAS	M	45a	55-1404-5	12/07/57	27/09/02	04/11/03		13
GBM	103	384	13	CSS	M	45a	55-5488-8	27/04/57	25/10/02	14/03/03		14
GBM	104	391	9	IPP	F	54a	55-7112-0	16/03/48	07/11/02	06/12/03		12
GBM	105	397	20	MCS	F	58a	55-8650-0	08/12/43	20/11/02	30/04//2003		5
GBM	106	405	30	JS	M	74a	16-1466-0	12/07/57	10/12/02	04/11/03		
GBM	107	427	25	AJS	F	51a	56-5920-5	11/11/51	23/01/03	13/07/03		5
GBM	108	442	27	MSS	M	68a	56-9206-7	12/05/34	17/02/03	18/06/03		4
GBM	109	450	54	CMT	F	61a	57-1498-2	26/08/41	06/03/03	13/05/04		14
GBM	110	458	55	MAA	M	62a	57-2532-1	23/04/42	16/03/03	15/07/03		3
GBM	111	485	57	ASS	M	67a	57-8817-0	18/02/36	01/05/03	30/11/03		6
GBM	112	496	58	SASC	F	57a	58-1738-2	30/10/45	22/05/03	25/01/04		8
GBM	113	498	61	GP	F	17a	58-1946-6	06/02/86	23/05/03	15/10/03		4
GBM	114	503	72	JRF	M	63a	58-3233-0	17/07/39	02/06/03	25/08/03		2
GBM	115	510	71	VRS	M	56a	58-4389-8	11/10/46	10/06/03	28/05/05		23
GBM	116	522	69	MFC	M	48a	58-6616-2	20/05/55	27/06/03	20/07/05		24
GBM	117	524	56	ZFR	F	59a	58-6807-6	05/11/43	30/06/03	11/03/04		8
GBM	118	547	75	AA	M	71a	59-1211-3	15/08/31	31/07/03	15/09/04		13
GBM	119	555	24A	ADM	M	57a	59-3422-2	20/07/46	14/08/03	16/02/05		18
GBM	120	573	70	EM	M	50a	59-6190-4	14/11/52	03/09/03	04/06/04		9
GBM	121	592	74	MRKMB	F	40a	59-9328-8	01/10/62	24/09/03		5a 5m	
GBM	122	629	79	JLS	M	64a	60-6149-4	25/06/38	11/11/03	15/01/05		14
GBM	123	632	77	VAP	F	41a	60-6580-5	15/08/62	13/11/03	23/03/06		28
GBM	124	638	13	VFC	M	55a	60-6580-5	15/08/62	13/11/03	28/01/04		2
GBM	125	640	85	LPS	F	58a	60-7753-6	12/12/44	21/11/03	13/05/04		5
GBM	126	642	59	NDT	M	42a	60-7749-8	14/04/62	21/11/03	04/05/05		17
GBM	127	663	82	AFP	M	66a	61-2537-9	11/12/37	05/12/03	06/08/04		7
GBM	128	684	81	ADM	F	56a	61-7187-7	15/12/47	12/02/04	18/05/04		1
GBM	129	687	84	LZ	M	45a	61-7615-1	07/03/58	16/02/04	28/12/04		9
GBM	130	698	83	ERL	M	58a	61-9020-0	25/09/45	27/02/04	15/12/04		7
GBM	131	724	68	ACF	F	62a	62-4884-5	01/02/42	08/04/04		4a 10m	

Diagnóstico	Caso	Número	AS3	Nome	Sexo	Idade*	No. do Anátomo Patológico	Data de Nascimento	Data de Cirurgia	Data de Óbito	Tempo de Seguimento*	Sobrevida (meses)
GBM	132	743	80	JPP	M	52a	62-8701-8	09/06/52	06/05/04	16/07/04		2
GBM	133	750	86	NR	M	51a	62-9711-0	23/09/52	13/05/04	25/11/04		6
GBM	134	792	N	IS	M	35a	63-8599-0	21/12/69	16/07/04	14/01/05		5
GBM	135	795	N	JCN	M	28a	63-9408-6	15/06/76	22/08/04	18/07/05		11
GBM	136	852	97	AG	M	60a	65-2002-2	19/08/44	22/10/04	05/12/05		13
GBM	137	854	90	GFS	M	46a	65-2828-7	17/06/58	27/10/04		4a 4m	
GBM	138	875	94	IS	M	35a	65-5776-7	21/12/69	23/11/04	14/01/05		
GBM	139	879	103	AM	M	61a	65-7270-7	27/07/43	02/12/04	18/03/05		3
GBM	140	881	95	JBF	M	49a	65-7715-6	25/01/55	07/12/04	22/04/05		4
GBM	141	884	97	ILR	F	52a	65-8286-9	15/01/52	10/12/04	08/04/07		27
GBM	142	885	N	MCG	F	86a	65-8283-4	24/04/18	10/12/04	23/02/05		2
GBM	143	891	98	FD	M	57a	65-9493-0	25/10/47	21/12/04	28/01/06		7
GBM	144	901	102	GMS	M	16a	66-0382-3	07/11/88	05/01/05	12/03/05		2
GBM	145	903	117	GSS	M	55a	66-0989-9	08/02/45	11/01/05	29/11/06		22
GBM	146	925	105	PMO	M	40a	66-5405-5	08/09/64	25/02/05	22/03/06		12
GBM	147	930	104	ASA	M	26a	66-6758-9	01/10/78	03/03/05	10/10/07		31
GBM	148	1002	108	MMC	M	40a	68-5149-5	29/01/65	15/07/05	04/10/05		2
GBM	149	1003	109	DGS	F	68a	68-5148-7	25/03/37	17/07/05	30/11/05		4
GBM	150	1007	117	MGSJ	F	28a	68-6084-2	18/06/77	22/07/05	18/11/05		3
GBM	151	1009	112	MAPL	F	38a	68-6226-8	25/10/66	25/07/05	12/03/06		21
GBM	152	1070	N	MR	M	72a	70-3955-7	09/03/33	29/11/05	05/08/06		8
GBM	153	1074	118	ILO	M	32a	70-4471-2	25/07/73	03/12/05		3a 11m	
GBM	154	1077	111	VAP	F	41a	70-6006-8	15/08/62	14/12/05	23/03/06		
GBM	155	1084	122	AJ	M	54a	70-9092-7	18/04/51	13/01/06	07/07/06		5
GBM	156	1091	124	WJGS	M	55a	71-1551-2	05/09/49	03/02/06	09/01/07		21
GBM	157	1103	137	AJ	M	54a	71-5874-2	18/04/1951	03/03/2006	07/07/06		
GBM	158	1118	130	APS	F	61a	72-2757-4	10/07/59	18/04/06	21/06/06		2
GBM	159	1122	123	AF	M	68a	72-4276-0	26/07/37	01/05/06	01/10/06		5
GBM	160	1123	131	EFS	M	53a	72-4527-0	29/10/53	02/05/06	21/04/07		11
GBM	161	1124	134	AE	M	63a	72-5103-3	19/03/43	05/05/06	20/09/06		4
GBM	162	1133	135	FCC	M	52a	72-8168-4	28/12/53	26/05/06	26/02/07		9
GBM	163	1144	133	SRS	M	76a	73-1961-4	15/08/29	25/06/06	07/09/06		2
GBM	164	1161	136	GFS	M	39a	2006-3702	13/01/67	26/07/06	08/11/07		13

Diagnóstico	Caso	Número	AS3	Nome	Sexo	Idade*	No. do Anátomo Patológico	Data de Nascimento	Data de Cirurgia	Data de Óbito	Tempo de Seguimento*	Sobrevida (meses)
GBM	165	1162	138	MES	F	68a	2006-4376	20/05/38	31/07/06	26/12/07		15
GBM	166	1169	139	VMSB	F	56a	2006-5805	13/03/50	09/08/06	05/01/08		2
GBM	167	1190	141	ESB	F	58a	2006-17398	16/09/48	24/10/06	24/12/07		9
GBM	168	1194	144	ASA	M	26a	2006-18928	01/10/78	03/11/06	10/10/07		
GBM	169	1199	142	FRN	M	30a	2006-21506	06/11/75	24/11/06	14/02/07		11
GBM	170	1205	143	OLAN	M	69a	2006-23080	13/12/36	05/12/06		2a 9m	
GBM	171	1212	107	FRN	M	31a	2007-0539	06/11/75	05/01/07	14/02/07		
GBM	172	1232	N	FBS	M	58a	2007-6934	07/04/48	16/02/07	29/02/08		12
GBM	173	1237	145	APN	M	59a	2007-7960	18/05/47	27/02/07	13/10/07		7
GBM	174	1243	N	VCT	M	47a	2007-10145	22/09/59	13/03/07	15/01/08		10
GBM	175	1250	146	MFL	M	63a	2007-13001	11/01/44	30/03/07	06/11/07		7

7.3. Anexo 3: Número do caso, dados de expressão gênica dos genes *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3*, *LOXL4*, *BMP1*, *HIF1A* e mutações do gene *IDH1*.

Caso	Ap	<i>LOX</i>	<i>LOXL1</i>	<i>LOXL2</i>	<i>LOXL3</i>	<i>LOXL4</i>	<i>BMP1</i>	<i>HIF1A</i>	<i>IDH1</i>
108	0	0,02	0,02	0,02	0,34	0,00	0,21	0,37	
132	0	0,00	0,03	0,03	0,96	0,01	0,15	1,29	
167	0	0,01	0,05	0,02	0,22	0,00	0,02	0,61	
173	0	0,02	0,02	0,04	0,39	0,00	0,04	0,45	
179	0	0,01	0,02	0,03	0,37	0,01	0,10	1,12	
189	0	0,04	0,03	0,04	0,25	0,00	0,20	0,77	
196	0	0,03	0,02	0,04	0,28	0,01	0,07	1,01	
226	0	0,05	0,03	0,02	0,41	0,00	0,08	0,92	
232	0	0,03	0,03	0,03	0,19	0,00	0,07	0,68	
237	0	0,00	0,02	0,03	0,13	0,00	0,03	0,77	
245	0	0,00	0,03	0,03	0,26	0,00	0,04	0,49	
263	0	0,00	0,02	0,05	0,20	0,01	0,08	1,15	
312	0	0,04	0,07	0,08	0,99	0,02	0,32	2,67	
330	0	0,02	0,05	0,01	0,48	0,00	0,10	1,78	
332	0	0,03	0,06	0,08	0,50	0,01	0,73	1,00	
349	0	0,06	0,04	0,09	1,34	0,06	0,62	1,55	
714	0	0,03	0,08	0,06	0,69	0,03	0,23	1,72	
755	0	0,03	0,14	0,05	0,46	0,03	0,20	1,80	
805	0	0,02	0,04	0,05	0,58	0,03	0,19	1,65	
861	0	0,05	0,08	0,10	0,45	0,05	0,26	2,71	
929	0	0,03	0,08	0,03	0,56	0,01	0,49	1,64	
969	0	0,02	0,16	0,04	0,42	0,01	0,45	1,87	
185	1	0,00	0,69	4,65	2,99	0,02	0,31	3,03	
335	1	0,09	0,10	0,39	5,69	0,01	0,35	3,78	
352	1	0,00	0,20	0,20	2,21	0,01	0,11	2,78	
363	1	0,08	0,35	0,75	8,25	0,09	0,67	5,80	
421	1	0,02	0,26	1,51	1,91	0,01	0,45	1,76	
436	1	0,00	0,61	0,66	6,30	0,01	1,19	4,40	
463	1	0,01	0,14	0,77	2,60	0,03	0,29	2,31	
495	1	0,04	0,09	0,21	1,84	0,01	0,41	0,61	
501	1	0,02	0,26	0,73	1,87	0,01	0,47	3,67	
570	1	0,14	0,56	2,31	4,03	0,03	0,75	6,01	
594	1	0,32	0,92	0,48	1,93	0,01	0,36	1,02	
601	1	0,35	0,37	1,61	1,41	0,01	0,80	6,90	
828	1	0,43	0,66	0,97	2,21	13,15	0,62	3,43	
878	1	0,01	0,09	0,34	2,50	0,01	0,44	2,05	
889	1	0,02	0,06	0,26	0,78	0,01	0,36	1,92	
892	1	0,04	0,03	0,89	1,46	0,02	0,34	4,48	
932	1	0,00	0,08	0,61	2,92	0,04	0,23	3,53	
946	1	0,31	0,83	0,77	1,77	0,09	0,41	1,66	
995	1	3,90	0,10	0,25	3,74	0,11	0,37	2,86	
1000	1	0,05	0,52	0,30	3,84	0,09	1,10	3,93	
1044	1	0,14	0,13	1,85	3,17	0,04	0,89	5,56	

Caso	Ap	LOX	LOXL1	LOXL2	LOXL3	LOXL4	BMP1	HIF1A	IDH1
1049	1	0,11	0,02	0,11	2,51	0,04	1,04	4,19	
1058	1	0,27	0,26	3,32	1,96	0,05	0,39	6,14	
55	2	0,28	0,53	0,45	0,84	0,02	0,87	0,87	0
76	2	0,02	0,01	0,08	1,65	0,00	0,44	3,55	R132H
101	2	0,00	0,00	0,11	0,37	0,00	0,42	13,24	R132H
118	2	0,00	0,05	0,11	1,73	0,01	0,35	4,83	R132H
239	2	0,00	0,01	0,05	0,56	0,00	0,38	4,33	R132H
250	2	0,00	0,04	0,03	0,35	0,00	0,04	1,80	R132H
254	2	0,00	0,01	0,09	1,27	0,01	0,22	4,84	R132H
267	2	0,02	0,03	0,06	0,88	0,01	0,02	4,60	R132H
328	2	0,28	0,18	0,26	0,39	0,03	0,05	0,91	0
341	2	0,00	0,04	0,08	0,95	0,00	0,16	2,75	R132H
346	2	0,14	0,43	0,63	1,30	0,02	0,10	4,10	0
392	2	0,00	0,01	0,03	0,66	0,00	0,03	2,23	0
412	2	0,00	0,06	0,11	5,14	0,01	0,06	7,61	R132H
452	2	0,04	0,03	0,35	2,57	0,01	0,07	7,45	R132H
453	2	0,08	0,01	0,58	2,66	0,01	0,03	6,17	R132H
467	2	0,01	0,01	0,05	0,95	0,00	0,04	3,42	R132H
490	2	0,01	0,01	0,12	2,32	0,00	0,13	3,25	R132H
577	2	0,02	0,01	0,20	0,72	0,00	0,18	6,57	R132H
715	2	0,03	0,08	0,28	2,31	0,01	0,29	6,02	0
806	2	0,00	0,01	0,04	0,74	0,01	0,12	3,20	R132H
999	2	0,03	0,02	0,05	0,36	0,01	0,14	3,73	R132H
1016	2	0,00	0,04	0,11	0,35	0,01	0,19	2,26	R132H
1095	2	0,77	0,03	1,02	1,23	0,00	0,42	15,24	R132H
1099	2	0,08	0,16	0,16	1,73	0,01	0,16	4,63	R132H
1113	2	0,01	0,07	0,22	1,42	0,01	0,21	5,89	R132H
1155	2	0,04	0,06	0,17	0,99	0,00	0,10	1,44	R132H
28	3	0,04	0,01	0,39	2,06	0,01	0,10	11,46	0
34	3	0,00	0,04	0,14	2,35	0,00	0,16	22,86	R132H
73	3	0,00	0,01	0,07	7,47	0,01	0,54	22,71	R132H
233	3	0,02	0,19	0,36	2,24	0,01	0,23	14,33	R132H
249	3	0,21	0,68	0,28	1,95	0,01	0,19	2,84	R132H
338	3	0,01	0,04	0,18	2,32	0,16	0,24	21,18	R132H
347	3	1,77	0,22	2,14	1,98	0,01	0,04	5,09	0
360	3	0,02	0,05	0,35	2,22	0,01	0,53	8,85	0
366	3	0,04	0,02	0,25	2,48	0,00	0,41	9,72	0
410	3	0,02	0,22	0,25	3,76	0,01	0,37	9,64	R132H
428	3	0,08	0,62	0,14	0,99	0,00	0,22	6,92	R132H
478	3	0,12	0,08	0,31	2,05	0,00	0,27	8,38	R132H
514	3	0,00	0,02	0,24	3,05	0,00	0,23	3,20	R132H
734	3	0,96	0,63	0,72	1,76	0,02	0,48	4,71	0
905	3	0,05	0,09	16,47	1,63	0,07	0,83	18,66	R132H
981	3	1,49	0,48	1,96	2,70	0,04	0,35	5,55	0
1033	3	0,09	0,03	0,24	1,02	0,02	0,34	13,73	R132H

Caso	Ap	LOX	LOXL1	LOXL2	LOXL3	LOXL4	BMP1	HIF1A	IDH1
1036	3	0,00	0,03	0,07	0,41	0,02	0,16	6,97	0
35	4	1,42	0,80	1,02	3,06	0,08	0,52	4,97	0
74	4	0,08	0,13	0,17	1,00	0,04	0,10	4,41	0
175	4	12,8	1,43	5,54	2,95	0,10	0,11	15,66	0
194	4	1,66	1,04	2,76	3,48	0,04	0,68	6,18	0
204	4	3,32	0,56	1,55	1,81	0,05	0,19	4,30	0
208	4	2,46	0,75	3,47	3,68	0,12	0,74	6,57	0
256	4	5,38	0,77	1,93	2,65	0,02	0,49	8,14	0
269	4	0,46	0,36	1,65	3,11	0,04	0,37	9,13	0
274	4	0,57	0,61	4,02	1,66	0,03	0,29	9,56	0
297	4	0,05	0,38	0,58	1,32	0,08	0,22	2,20	0
317	4	0,05	0,08	0,89	2,61	0,03	0,10	4,19	0
356	4	1,86	0,11	1,38	2,18	0,01	0,48	8,20	0
370	4	0,59	0,64	2,33	3,49	0,02	0,91	3,69	0
384	4	1,41	0,21	0,98	1,57	0,01	0,38	3,65	0
391	4	2,28	2,84	2,60	2,31	0,04	1,37	9,48	0
397	4	0,09	0,04	1,80	3,05	0,02	0,08	2,65	R132H
405	4	5,70	0,94	2,83	1,55	0,04	0,45	4,39	0
427	4	1,20	1,34	2,22	4,82	2,22	0,90	12,41	0
442	4	0,77	2,06	2,40	2,73	0,12	0,49	8,78	0
450	4	25,80	0,08	0,93	2,39	0,02	0,15	7,38	0
458	4	0,32	0,25	1,45	4,33	0,03	0,14	7,57	0
485	4	0,51	0,10	1,14	6,41	0,07	0,56	2,64	0
496	4	1,00	0,34	2,31	9,66	0,16	1,44	46,12	0
498	4	0,04	0,10	0,40	0,97	0,02	0,11	2,75	0
503	4	2,52	0,10	1,69	2,58	0,04	0,50	8,32	0
510	4	4,33	0,28	1,17	1,07	0,10	0,23	9,22	0
522	4	0,29	1,21	2,13	4,48	0,06	0,19	4,79	R132H
524	4	1,00	0,84	1,32	3,05	0,04	0,33	15,15	0
547	4	14,37	0,32	3,67	4,30	0,01	0,26	6,99	R132H
555	4	0,36	0,23	0,28	2,29	0,02	0,21	3,76	0
573	4	13,76	0,53	3,78	2,29	0,01	0,54	34,23	0
592	4	0,55	0,17	0,93	1,29	0,02	0,65	4,86	0
629	4	2,36	0,93	2,27	1,78	0,09	0,70	7,26	0
632	4	0,16	0,05	0,42	0,89	0,01	0,12	4,13	R132H
638	4	1,91	0,79	3,78	5,99	0,02	0,38	9,36	0
640	4	0,37	0,55	1,46	3,09	0,05	0,83	6,21	0
642	4	1,84	0,51	0,86	2,93	0,00	0,34	10,95	0
663	4	25,67	0,25	2,46	1,22	0,02	0,06	8,92	0
684	4	0,10	0,15	0,65	1,77	0,01	0,27	2,59	0
724	4	1,84	2,05	5,61	3,21	0,01	0,32	32,38	0
743	4	15,17	0,79	1,51	2,38	0,02	0,50	15,44	0
750	4	1,45	1,18	4,70	1,70	0,04	0,21	13,11	0
792	4	0,01	0,22	0,41	4,97	0,06	0,51	2,28	0

Caso	Ap	LOX	LOXL1	LOXL2	LOXL3	LOXL4	BMP1	HIF1A	IDH1
795	4	12,06	2,80	2,82	1,94	0,03	0,61	9,73	0
852	4	1,63	0,68	2,65	2,49	0,02	1,44	10,22	0
854	4	0,34	0,11	1,49	4,43	0,02	0,73	29,41	0
875	4	2,59	0,33	2,18	2,92	0,02	0,69	6,34	0
879	4	0,92	0,44	1,48	1,22	0,01	0,19	2,71	0
881	4	1,19	1,77	3,02	1,17	0,01	0,24	11,07	0
884	4	2,42	0,19	1,06	1,15	0,04	0,32	10,78	0
885	4	3,67	0,29	1,43	3,81	0,04	0,72	6,52	0
891	4	0,32	0,29	0,89	4,10	0,02	1,06	6,39	0
901	4	1,14	0,24	6,65	3,48	0,00	1,37	49,45	R132H
903	4	14,42	1,31	8,63	1,40	0,20	1,41	53,62	0
925	4	16,83	0,18	0,61	1,75	0,06	2,42	31,52	0
930	4	0,35	0,04	0,48	0,54	0,00	1,85	19,01	R132H
1002	4	1,79	8,37	3,06	7,09	0,39	1,90	24,01	0
1003	4	6,24	0,13	0,26	1,29	0,01	0,27	2,26	0
1007	4	0,40	0,38	0,71	0,12	0,00	0,20	7,08	R132H
1009	4	12,78	0,08	1,36	0,21	0,01	0,04	0,54	0
1070	4	0,12	0,24	0,36	1,39	0,01	0,26	9,34	0
1074	4	2,95	0,34	2,30	1,47	0,00	0,35	9,94	0
1077	4	0,20	0,35	0,58	2,38	0,09	0,37	6,17	R132H
1084	4	45,78	1,53	6,50	2,68	0,02	1,57	16,99	0
1091	4	1,59	0,93	0,48	1,01	0,01	0,46	4,94	0
1103	4	0,57	0,72	1,08	1,80	0,02	0,23	13,28	0
1118	4	1,41	0,64	1,02	2,83	0,10	0,68	10,60	0
1122	4	3,35	2,70	3,51	2,27	0,07	0,39	6,59	0
1123	4	0,26	0,65	0,83	1,51	0,01	0,45	11,22	0
1124	4	0,91	0,11	0,09	0,97	0,05	0,27	3,01	0
1133	4	1,28	0,12	1,71	3,03	0,02	0,29	9,63	0
1144	4	0,30	0,15	1,15	1,00	0,02	0,17	5,83	0
1161	4	5,46	0,72	1,58	1,61	0,07	0,37	12,28	0
1162	4	0,12	0,48	0,19	1,40	0,02	0,18	5,42	0
1169	4	39,18	1,16	2,21	4,60	0,05	0,36	6,95	0
1190	4	14,85	0,46	1,57	1,91	0,01	0,34	12,62	0
1194	4	0,09	0,05	0,19	0,31	0,16	0,15	5,05	R132H
1199	4	1,01	0,07	0,45	0,89	0,02	0,20	13,53	R132H
1205	4	1,49	0,18	0,50	0,80	0,04	0,26	13,85	0
1212	4	0,64	0,01	0,22	1,95	0,19	0,35	7,06	R132H
1232	4	6,46	0,02	1,25	1,94	0,08	0,06	6,44	0
1237	4	1,95	0,45	0,57	1,12	0,00	0,48	7,64	0
1243	4	4,24	0,78	2,59	2,90	0,02	0,44	5,61	0
1250	4	6,61	1,11	1,57	1,47	0,01	0,29	6,21	0

Número do caso; AP- anátomo patológico: 0= casos controle de tecido não tumoral; 1= astrocitoma pilocítico; 2=;astrocitoma grau II; 3= astrocitoma grau III; 4= astrocitoma grau IV (GBM); LOX: gene da lisil oxidase 1; LOXL2: gene da lisil oxidase 2; LOXL3: gene da lisil oxidase 3; LOXL4: gene da lisil oxidase 4; IDH1: gene da isocitrato desidrogenase.

7.4. Anexo 4- Termo de Consentimento Informado

Termo de Consentimento Pós-Informado

Você está sendo admitido(a) neste hospital para 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 toma 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 o 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 das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, de acordo com o processo nº 830/D1, e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital.

Todo material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade será preservada. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo 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 concordar 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 Responsável Legal: _____

Nome do(a) paciente: _____

RG do Prontuário Médico: _____

Médico Responsável: _____

LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÕES EM NEUROLOGIA

Fones: 3061-4036 / 3061-7471 / 3062-0620 - Célia

8 *REFERÊNCIAS*

Abourbih DA, Di Cesare S, Orellana ME, Anteck E, Martins C, Petrucci LA, Burnier MN Jr. Lysyl oxidase expression and inhibition in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 2010; 20:97-106.

Agra N, Cidre F, García-García L, de la Parra J, Alonso J. Lysyl oxidase is downregulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and its propeptide domain displays tumor suppressor activities in ewing sarcoma cells. *PLoS One.* 2013; 8:e66281.

Ahn SG, Dong SM, Oshima A, Kim WH, Lee HM, Lee SA, Kwon SH, Lee JH, Lee JM, Jeong J, Lee HD, Green JE. LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 141:89-99.

Akiri G, Sabo E, Dafni H, Vadasz Z, Kartvelishvily Y, Gan N, Kessler O, Cohen T, Resnick M, Neeman M, Neufeld G. Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res.* 2003; 7:1657-1666.

Albinger-Hegy A, Stoeckli SJ, Schmid S, Storz M, Iotzova G, Probst-Hensch NM, Rehrauer H, Tinguely M, Moch H, Hegyi I. Lysyl oxidase expression is an independent marker of prognosis and a predictor of lymph node metastasis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC). *Int J Cancer.* 2010; 126: 2653-2662.

Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol.* 2011; 223:162-176.

Arem AJ, Madden JW, Chvapil M, Tillema L. Effect of lysyl oxidase inhibition of healing wounds. *Surg Forum.* 1975; 26:67-69.

Bais MV, Nugent MA, Stephens DN, Sume SS, Kirsch KH, Sonenshein GE, Trackman PC. Recombinant lysyl oxidase propeptide protein inhibits growth and promotes apoptosis of pre-existing murine breast cancer xenografts. *PLoS One.* 2012; 7:e31188.

Baker AM, Cox TR, Bird D, Lang G, Murray GI, Sun XF, Southall SM, Wilson JR, Erler JT. The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103:407-424.

Baker AM, Bird D, Welte JC, Gourlaouen M, Lang G, Murray GI, Reynolds AR, Cox TR, Erler JT. Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2013; 73:583-594.

Barker HE, Cox TR, Erler JT. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012; 8:540-552.

Barker HE, Erler JT. The potential for LOXL2 as a target for future cancer treatment. *Future Oncol.* 2011; 6:707-710.

Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, McCauley S, Rodriguez HM, Oyasu M, Mikels A, Vaysberg M, Ghermazien H, Wai C, Garcia CA, Velayo AC, Jorgensen B, Biermann D, Tsai D, Green J, Zaffryar-Eilot S, Holzer A, Ogg S,

Thai D, Neufeld G, Van Vlasselaer P, Smith V. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med*. 2010; 16:1009-1017.

Basuroy S, Dunagan M, Sheth P, Seth A, Rao RK. Hydrogen peroxide activates focal adhesion kinase and c-Src by a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent mechanism and promotes cell migration in Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010; 299:G1861-95.

Bennewith KL, Dedhar S. Targeting hypoxic tumour cells to overcome metastasis. *BMC Cancer*. 2011; 11:504.

Bertoldi ER. Identificação de genes relacionados a LOX, em glioblastoma através do silenciamento por siRNA. Monografia - Aprimoramento Profissional FMUSP- 2012; pag. 9.

Bond JS & Beynon RJ .The astacin family of metalloendopeptidases *Protein Science*; 1995, 4:1247-1261.

Bondareva A, Downey CM, Ayres F, Liu W, Boyd SK, Hallgrimsson B, Jirik FR. The lysyl oxidase inhibitor, beta aminopropionitrile, diminishes the metastatic colonization potential of circulating breast cancer cells. *PLoS One*. 2009; 4:e5620

Bouez C, Reynaud C, Noblesse E, Thépot A, Gleyzal C, Kanitakis J, Perrier E, Damour O, Sommer P. The lysyl oxidase LOX is absent in basal and squamous cell carcinomas and its knockdown induces an invading phenotype in a skin equivalent model. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:1463-1469.

Brekman V, Lugassie J, Zaffryar-Eilot S, Sabo E, Kessler O, Smith V, Golding H, Neufeld G. Receptor activity modifying protein-3 mediates the pro tumorigenic activity of lysyl oxidase-like protein-2. *FASEB J*. 2011; 25:55-65.

Canesin G, Cuevas EP, Santos V, López-Menéndez C, Moreno-Bueno G, Huang Y, Csiszar K, Portillo F, Peinado H, Lyden D, Cano A. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) and E47 EMT factor: novel partners in E-cadherin repression and early metastasis colonization. *Oncogene*. 2014; 17 (em publicação).

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394:485-490.

Cassavaugh J, Lounsbury, KM. Hypoxia-mediated biological control. *J Cell Biochem*. 2011; 112: 735-744.

Chen H, Sun B, Zhao Y, Song X, Fan W, Zhou K, Zhou L, Mao Y, Lu .Fine mapping of a region of chromosome 11q23.3 reveals independent locus associated with risk of glioma. *PLoS One*. 2012; 7:e52864.

Chesnelong C, Chaumeil MM, Blough MD, Al-Najjar M, Stechishin OD, Chan JA, Pieper RO, Ronen SM, Weiss S, Luchman HA, Cairncross JG. Lactate dehydrogenase A silencing in IDH mutant gliomas. *Neuro Oncol.* 2014; 16:686-695.

Chu IM, Michalowski AM, Hoenerhoff M, Szauter KM, Luger D, Sato M, Flanders K, Oshima A, Csiszar K, Green JE. GATA3 inhibits lysyl oxidase-mediated metastases of human basal triple-negative breast cancer cells. *Oncogene.* 2012; 31:2017-2027.

Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, Ang KK, El-Naggar AK, Zanation AM, Cmelak AJ, Levy S, Slebos RJ, Yarbrough WG. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2006; 16:8210-8218.

Contente S, Kenyon K, Rimoldi D, Friedman RM. Expression of gene *rrg* is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras. *Science* 1990; 249:796-798.

Contente S, Yeh T-JA, Friedman RM. Tumor suppressive effect of lysyl oxidase proenzyme. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793:1272-1278.

Collins VP. Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 2004; 75 Suppl 2:ii2-11.

Cox TR, Bird D, Baker AM, Barker HE, Ho MW, Lang G, Erler JT. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res.* 2013; 73:1721-1732.

Csiszar K, Entersz I, Trackman PC, Samid D, Boyd CD. Functional analysis of the promoter and first intron of the human lysyl oxidase gene. *Mol Biol Rep.* 1996; 23:97-108.

Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001; 70:1-32.

Cuevas EP, Moreno-Bueno G, Canesin G, Santos V, Portillo F, Cano A. LOXL2 catalytically inactive mutants mediate epithelial-to-mesenchymal transition. *Biol Open.* 2014; 3:129-137.

Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009; 462:739-744.

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 Oncol.* 2012; 5:v1-49.

Dong Y, Xie X, Wang Z, Hu C, Zheng Q, Wang Y, Chen R, Xue T, Chen J, Gao D, Wu W, Ren Z, Cui J. Increasing matrix stiffness upregulates vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma cells mediated by integrin $\beta 1$. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 444:427-432.

Dubbink HJ, Taal W, van Marion R, Kros JM, van Heuvel I, Bromberg JE, Zonnenberg BA, Zonnenberg CB, Postma TJ, Gijtenbeek JM, Boogerd W, Groenendijk FH, Smitt PA, Dinjens WN, van den Bent MJ. IDH1 mutations in low-grade astrocytomas predict survival but not response to temozolomide. *Neurology*. 2009; 73:1792-1795.

Eiseler T, Köhler C, Nimmagadda SC, Jamali A, Funk N, Joodi G, Storz P, Seufferlein T. Protein kinase D1 mediates anchorage-dependent and -independent growth of tumor cells via the zinc finger transcription factor Snail1. *J Biol Chem*. 2012; 287:32367-32380.

El-Osta A, Wolffe AP. DNA methylation and histone deacetylation in the control of gene expression: basic biochemistry to human development and disease. *Gene Expr*. 2000; 9:63-75.

Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*. 2006; 440:1222-1226.

Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le QT, Giaccia AJ. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*. 2009; 15:35-44.

Farjanel J, Sève S, Borel A, Sommer P, Hulmes DJ. Inhibition of lysyl oxidase activity can delay phenotypic modulation of chondrocytes in two-dimensional culture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005; 13:120-128.

Fong SF, Dietzsch E, Fong KS, Hollosi P, Asuncion L, He Q, Parker MI, Csiszar K. Lysyl oxidase-like 2 expression is increased in colon and esophageal tumors and associated with less differentiated colon tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007; 46:644-655.

Frezza C, Tennant DA, Gottlieb E. IDH1 mutations in gliomas: when an enzyme loses its grip. *Cancer Cell*. 2010; 17:7-9.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 2007; 21:2683-2710.

Gao Y, Xiao Q, Ma H, Li L, Liu J, Feng Y, Fang Z, Wu J, Han X, Zhang J, Sun Y, Wu G, Padera R, Chen H, Wong KK, Ge G, Ji H. LKB1 inhibits lung cancer progression through lysyl oxidase and extracellular matrix remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:18892-18897.

- Gansner JM, Mendelsohn BA, Hultman KA, Johnson SL, Gitlin JD. Essential role of lysyl oxidases in notochord development. *Dev Biol.* 2007; 307:202-213.
- Ge G, Greenspan DS. Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res C. Embryo Today* 2006; 78:47-68.
- Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD. Control of copper status for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005; 5:543-549.
- Görögh T, Weise JB, Holtmeier C, Rudolph P, Hedderich J, Gottschlich S, Hoffmann M, Ambrosch P, Csiszar K. Selective upregulation and amplification of the lysyl oxidase like-4 (LOXL4) gene in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2007; 212:74-82.
- Görögh T, Holtmeier C, Weise JB, Hoffmann M, Ambrosch P, Laudien M, Csiszar K. Functional analysis of the 5' flanking domain of the LOXL4 gene in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2008; 33:1091-1098.
- Gross J, Levene CI, Orloff S. Fragility and extractable collagen in the lathyrotic chick embryo. An assay for lathyrogenic agents. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1960; 105:148-151.
- Hamalainen ER, Jones TA, Sheer D, Taskinen K, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Molecular cloning of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5q23.3-31.2. *Genomics* 1991; 11:508-516.
- Hamalainen ER, Kempainen R, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Structure of the human lysyl oxidase gene. *Genomics* 1993; 17:544-548.
- Harris AL. Hypoxia - a key regulatory factor in tumor growth. *Nature Rev Cancer.* 2001; 2:38-46.
- Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, Von Deimling A. 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; 118:469-474.
- Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2007; 117:3810-3820.
- Hirota SA, Beck PL, MacDonald JA. Targeting hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling in therapeutics: implications for the treatment of inflammatory bowel disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2009; 3:1-16.

- Hollosi P, Yakushiji JK, Fong KS, Csiszar K, Fong SF. Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells.. *Int J Cancer*. 2009; 125:318-327.
- Holtmeier C, Görögh T, Beier U, Meyer J, Hoffmann M, Gottschlich S, Heidorn K, Ambrosch P, Maune S. Overexpression of a novel lysyl oxidase-like gene in human head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res*. 2003; 23:2585-2591.
- Ichimura K, Pearson DM, Kocalkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DT, Collins VPIDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol*. 2009; 11:341-347.
- Iftikhar M, Hurtado P, Bais MV, Wigner N, Stephens DN, Gerstenfeld LC, Trackman PC. Lysyl oxidase-like-2 (LOXL2) is a major isoform in chondrocytes and is critically required for differentiation. *J Biol Chem*. 2011; 286:909-918.
- Ito H, Akiyama H, Iguchi H, Iyama K, Miyamoto M, Ohsawa K, Nakamura T. Molecular cloning and biological activity of a novel lysyl oxidase-related gene expressed in cartilage. *J Biol Chem*. 2001; 276:24023-24029.
- Ji F, Wang Y, Qiu L, Li S, Zhu J, Liang Z, Wan Y, Di W. Hypoxia inducible factor 1 α -mediated LOX expression correlates with migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Int J Oncol*. 2013; 42:1578-1588.
- Jiang WP, Sima ZH, Wang HC, Zhang JY, Sun LS, Chen F, Li TJ. Identification of the involvement of LOXL4 in generation of keratocystic odontogenic tumors by RNA-Seq analysis. *Int J Oral Sci*. 2014; 6:31-38.
- Johnson DR; O'Neill, BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J. Neurooncol*. 2012;.107:359-364.
- Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem*. 2003; 88:660-672.
- Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, Tatematsu M, Kaminishi M, Sugimura T, Ushijima T. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res*. 2004; 64: 6410-6415.
- Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*. 2002; 12:66–64.
- Kenyon K, Contente S, Trackman PC, Tang J, Kagan HM, Friedman RM. Lysyl oxidase and rrg messenger RNA. *Science*. 1991; 253:802.
- Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science*. 1996; 271:360-362.

Kim BR, Dong SM, Seo SH, Lee JH, Lee JM, Lee SH, Rho SB. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) controls tumor-associated cell proliferation through the interaction with MARCKSL1. *Cell Signal*. 2014; 9:1765-1773.

Kim M, Choe S. BMPs and their clinical potentials. *BMB Reports*. 2011; 44:619–634. Kim MS, Kim SS, Jung ST, Park JY, Yoo HW, Ko J, Csisar K, Choi SY, Kim Y. Expression and purification of enzymatically active forms of the human lysyl oxidase-like protein 4. *J Biol Chem*. 2003; 278:52071-52074.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006; 3:177-185.

Kirschmann DA, Seftor EA, Nieva DR, Mariano EA, Hendrix MJ. Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1999; 55:127-136.

Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, Nieva DR, Sullivan CM, Edwards EM, Sommer P, Csiszar K, Hendrix MJ. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2002; 62:4478-4483.

Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest*. 2005; 85:154-159.

Kumar P, Yadav A, Patel SN, Islam M, Pan Q, Merajver SD, Teknos TN. Tetrathiomolybdate inhibits head and neck cancer metastasis by decreasing tumor cell motility, invasiveness and by promoting tumor cell anoikis. *Mol Cancer*. 2010; 9:206.

Laczko R, Szauter KM, Jansen MK, Hollosi P, Muranyi M, Molnar J, *et al*. Active lysyl oxidase (LOX) correlates with focal adhesion kinase (FAK)/paxillin activation and migration in invasive astrocytes. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007; 33:631-643.

Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:811-816.

Lazarus HM, Cruikshank WW, Narasimhan N, Kagan HM, Center DM. Induction of human monocyte motility by lysyl oxidase. *Matrix Biol*. 1995; 14:727-731.

Le QT, Harris J, Magliocco AM, Kong CS, Diaz R, Shin B, Cao H, Trotti A, Erler JT, Chung CH, Dicker A, Pajak TF, Giaccia AJ, Ang KK. Validation of lysyl oxidase as a prognostic marker for metastasis and survival in head and neck squamous cell carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group trial 90-03. *J Clin Oncol*. 2009; 26:264281-264286.

Lee GH, Kim DS, Chung MJ, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. Lysyl oxidase-like-1 enhances lung metastasis when lactate accumulation and monocarboxylate transporter expression are involved. *Oncol Lett.* 2011; 5:831-838.

Lee JE, Kim Y. A tissue-specific variant of the human lysyl oxidase-like protein 3 (LOXL3) functions as an amine oxidase with substrate specificity. *J Biol Chem.* 2006; 281:37282-90.

Lee SM, Park SY, Shin SW, Kil IS, Yang ES, Park JW. Silencing of cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase by small interfering RNA enhances the sensitivity of HeLa cells toward staurosporine. *Free Radic Res.* 2009; 43:165-173.

Levayer R, Lecuit T. Breaking down EMT. *Nat Cell Biol.* 2008; 10:757-759.

Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signalling. *Cell.* 2009; 139:891- 906.

Levene Ci, Gross J. Alterations in state of molecular aggregation of collagen induced in chick embryos by beta-aminopropionitrile (lathyrus factor). *J Exp Med.* 1959; 110:771-790.

Li W, Nellaiappan K, Strassmaier T, Graham L, Thomas KM, Kagan HM. Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:12817-12822.

Li TY, Xu LY, Wu ZY, Liao LD, Shen JH, Xu XE, Du ZP, Zhao Q, Li EM. Reduced nuclear and ectopic cytoplasmic expression of lysyl oxidase-like 2 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2012; 43:1068-1076.

Li W, Liu G, Chou IN, Kagan HM. Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 2000; 78:550-557.

Li W, Zhou J, Chen L, Luo Z, Zhao Y. Lysyl oxidase, a critical intra- and extra-cellular target in the lung for cigarette smoke pathogenesis. *Int J Environ Res Public Health.* 2011; 8:161-184.

Liang JJ, Zhu S, Bruggeman R, Zaino RJ, Evans DB, Fleming JB, Gomez HF, Zander DS, Wang H. 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; 19:2598-2604.

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; 25:402-408.

Loenarz C, Schofield CJ. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat Chem Biol.* 2008; 4:152-156.

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; 2:97-109.

Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: An oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63:2304-2316.

Maki JM, Kivirikko KI. Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *Biochem J.* 2001; 355:381-387.

Mäki JM, Räsänen J, Tikkanen H, Sormunen R, Mäkilä K, Kivirikko KI, Soininen R. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation.* 2002; 106:2503-2509.

Mammoto T, Jiang A, Jiang E, Panigrahy D, Kieran MW, Mammoto A. Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression. *Am J Pathol.* 2013; 183:1293-1305.

Mariani TJ, Trackman PC, Kagan HM, Eddy RL, Shows TB, Boyd CD, Deak SB. The complete derived amino acid sequence of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5. *Matrix.* 1992; 12:242-248.

Marie SKN, Okamoto OK, Uno M, Hasegawa APG, Oba-Shinjo SM, Cohen T, Camargo AA, Kosoy A, Carlotti CG Jr, Toledo S, Moreira-Filho CA, Zago MA, Simpson AJ, Caballero OL. Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int J Cancer.* 2008; 122: 807-815.

Martin JE, Sosa-Melgarejo JA, Swash M, Mather K, Leigh PN, Berry CL. Purkinje cell toxicity of beta-aminopropionitrile in the rat. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1991; 419:403-408.

Maruhashi T, Kii I, Saito M, Kudo A. Interaction between periostin and BMP-1 promotes proteolytic activation of lysyl oxidase. *J Biol Chem.* 2010; 285:13294-13303.

Mayorca-Guiliani A, Erler JT. The potential for targeting extracellular LOX proteins in human malignancy. *Oncotargets Ther.* 2013; 6:1729-1735.

Michieli, P. Hypoxia, angiogenesis and cancer therapy: To breathe or not to breathe? *Cell Cycle.* 2009; 20:3291-3296.

Min C, Kirsch KH, Zhao Y, Jeay S, Palamakumbura AH, Trackman PC, Sonenshein GE. The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer. *Cancer Res.* 2007; 67:1105-1112.

Min C, Zhao Y, Romagnoli M, Trackman PC, Sonenshein GE, Kirsch KH. Lysyl oxidase propeptide sensitizes pancreatic and breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Cell Biochem.* 2010; 111:1160-1168.

Minard KI, McAlister-Henn L. Dependence of peroxisomal beta-oxidation on cytosolic sources of NADPH. *J Biol Chem.* 1999; 274:3402-3406.

Molnar J, Fong KS, He QP, Hayashi K, Kim Y, Fong SF, Fogelgren B, Szauter KM, Mink M, Csiszar K. Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1647:220-224.

Moreno-Bueno G, Salvador F, Martín A, Floristán A, Cuevas EP, Santos V, Montes A, Morales S, Castilla MA, Rojo-Sebastián A, Martínez A, Hardisson D, Csiszar K, Portillo F, Peinado H, Palacios J, Cano A. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas. *EMBO Mol Med.* 2011; 3:528-544.

Murano S, Thweatt R, Reis RJS, Jones RA, Moerman EJ, Goldstein S. Diverse gene sequences are overexpressed in Werner syndrome fibroblasts undergoing premature replicative senescence. *Mol Cell Biol.* 1991; 11:3905-3914.

Mustafa D, Swagemakers S, French P, Luider TM, van der Spek P, Kremer A, Kros JM. Structural and expression differences between the vasculature of pilocytic astrocytomas and glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013; 72:1171-11781.

Narahara K, Kimura S, Kikkawa K, Takahashi Y, Wakita Y, Kasai R, Nagai S, Nishibayashi Y, Kimoto H. Probable assignment of soluble isocitrate dehydrogenase (IDH1) to 2q33.3. *Hum Genet.* 1985; 71:37-40.

Nellaiappan K, Risitano A, Liu G, Nicklas G, Kagan HM. Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. *J Cell Biochem.* 2000; 79:576-582.

Nishioka T, Eustace A, West C. Lysyl oxidase: from basic science to future cancer treatment. *Cell Struct. Funct.* 2012; 37:75-80.

Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:6002-6007.

Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloso CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K; Cancer Genome Atlas Research Network. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010; 17:510-522.

Ohgaki H, Kleihues P The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19:764-772.

Osawa T, Ohga N, Akiyama K, Hida Y, Kitayama K, Kawamoto T, Yamamoto K, Maishi N, Kondoh M, Onodera Y, Fujie M, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K. Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer.* 2013; 109:2237-2247.

Palamakumbura AH, Jeay S, Guo Y, Pischon N, Sommer P, Sonenshein GE, Trackman PC. The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells. *J Biol Chem.* 2004; 279:40593-405600.

Palamakumbura AH, Vora SR, Nugent MA, Kirsch KH, Sonenshein GE, Trackman PC. Lysyl oxidase propeptide inhibits prostate cancer cell growth by mechanisms that target FGF-2-cell binding and signaling. *Oncogene.* 2009; 28:3390-3400.

Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, De Carvalho M, Mesri EA, Robins DM, Dick RD, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 2002;62:4854-4859.

Panchenko MV, Stetler-Stevenson WG, Trubetskoy OV, Gacheru SN, Kagan HM. Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysin oxidase: Potential role of procollagen C-proteinase. *J Biol Chem.* 1996; 271:7113-7119.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008; 321:1807-1812.

Park HJ, Gusarova G, Wang Z, Carr JR, Li J, Kim KH, Qiu J, Park YD, Williamson PR, Hay N, Tyner AL, Lau LF, Costa RH, Raychaudhuri P. Deregulation of FoxM1b leads to tumour metastasis. *EMBO Mol Med.* 2011; 3:21-34.

Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF, Csiszar K, Hendrix MJ, Kirschmann DA. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res.* 2005; 65:11429-11436.

Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA. Lysyl oxidase regulates actin filament formation through the p130(Cas)/Crk/DOCK180 signaling complex. *J Cell Biochem.* 2006; 4:827-837.

Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer- a prospect. *J Cell Biochem.* 2007; 6:1338-1354.

Peinado H, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Pérez-Gómez E, Santos V, Mendiola M, de Diego JI, Nistal M, Quintanilla M, Portillo F, Cano A. Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 2008; 68:4541-4550.

Peng L, Ran YL, Hu H, Yu L, Liu Q, Zhou Z, Sun YM, Sun LC, Pan J, Sun LX, Zhao P, Yang ZH. Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway. *Carcinogenesis.* 2009; 10:1660-1669.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406:747-752.

Pez F, Dayan F, Durivault J, Kaniewski B, Aimond G, Le Provost GS, Deux B, Clézardin P, Sommer P, Pouysségur J, Reynaud C. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth. *Cancer Res.* 2011; 71:1647-1657.

Ping W, Jiang WY, Chen WS, Sun W, Fu XN. Expression and significance of hypoxia inducible factor-1 α and lysyl oxidase in non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14:3613-368.

Pischoon N, Mäki JM, Weisshaupt P, Heng N, Palamakumbura AH, N'Guessan P, Ding A, Radlanski R, Renz H, Bronckers TA, Myllyharju J, Kielbassa AM, Kleber BM, Bernimoulin JP, Trackman PC. Lysyl oxidase (lox) gene deficiency affects osteoblastic phenotype. *Calcif Tissue Int.* 2009; 85:119-126.

Polgar N, Fogelgren B, Shipley JM, Csiszar K. Lysyl oxidase interacts with hormone placental lactogen and synergistically promotes breast epithelial cell proliferation and migration. *J Biol Chem.* 2007; 282: 3262-3272.

Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med.* 2004; 82:656-670.

Ren J, Wu X, He W, Shao J, Cheng B, Huang T. Lysyl oxidase 473 G>A polymorphism and breast cancer susceptibility in Chinese Han population. *DNA Cell Biol.* 2011; 30:111-116.

Rodríguez C, Rodríguez-Sinovas A, Martínez-González J. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect.* 2008; 21:218-24.

Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 2000; 24:227-235.

Rückert F, Joensson P, Saeger HD, Grützmann R, Pilarsky C. Functional analysis of LOXL2 in pancreatic carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2010; 3:303-311.

Saad FA, Torres M, Wang H, Graham L. Intracellular lysyl oxidase: effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 396:944-949.

Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:6392-6397.

Sakai M, Kato H, Sano A, Tanaka N, Inose T, Kimura H, Sohda M, Nakajima M, Kuwano H. Expression of lysyl oxidase is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16:2494-2501.

Sánchez-Morgan N, Kirsch KH, Trackman PC, Sonenshein GE. The lysyl oxidase propeptide interacts with the receptor-type protein tyrosine phosphatase kappa and inhibits β -catenin transcriptional activity in lung cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2011; 31:3286-3297.

Sato S, Trackman PC, Mäki JM, Myllyharju J, Kirsch KH, Sonenshein GE. The Ras signaling inhibitor LOX-PP interacts with Hsp70 and c-Raf to reduce Erk activation and transformed phenotype of breast cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2011; 31:2683-2695.

Sebban S, Davidson B, Reich R, Virchows Arch.. Lysyl oxidase-like 4 is alternatively spliced in an anatomic site-specific manner in tumors involving the serosal cavities. *Virchows Arch*. 2009; 454:71-79.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 10:721-732.

Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992; 12:5447-5454.

Schietke R, Warnecke C, Wacker I, Schödel J, Mole DR, Campean V, Amann K, Goppelt-Strube M, Behrens J, Eckardt KU, Wiesener MS. The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *J Biol Chem*. 2010; 285:6658-6669.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3:1101-1108.

Schmidt H, Semjonow A, Csiszar K, Korsching E, Brandt B, Eltze E. Mapping of a deletion interval on 8p21-22 in prostate cancer by gene dosage PCR. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2007; 91:302-307.

Scola N, Görögh T. LOXL4 as a selective molecular marker in primary and metastatic head/neck carcinoma. *Anticancer Res.* 2010; 30:4567-4571.

Sebban S, Davidson B, Reich R, Virchows Arch.. Lysyl oxidase-like 4 is alternatively spliced in an anatomic site-specific manner in tumors involving the serosal cavities. *Virchows Arch.* 2009; 454:71-79.

Sheridan PJ, Kozar LG, Benson SC (1979) Increased lysyl oxidase activity in aortas of hypertensive rats and effect of betaaminopropionitrile. *Exp Mol Pathol.* 1979; 30:315-324.

Shih YH, Chang KW, Chen MY, Yu CC, Lin DJ, Hsia SM, Huang HL, Shieh TM. Lysyl oxidase and enhancement of cell proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2013; 35:250-256.

Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: Properties, regulation and multiple functions in biology. *Mat Biol* 1998; 16:387-398.

Stassar MJ, Devitt G, Brosius M, Rinnab L, Prang J, Schradin T, Simon J, Petersen S, Kopp-Schneider A, Zöller M. Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer.* 2001; 85:1372-1382.

Sterchi EE, Stöcker W, Bond JS. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 2008; 29:309-328.

Surawics TS, McCarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM, Davis FG. The collaborating registries of the Central Brain Tumor Registry of the United States. Descriptive epidemiology of the primary brain and CNS tumors: results from the central brain tumor registry of the United States, 1990-1994. *Neuro Oncol.* 1999; 1:14-25.

Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, Haab BB, Teh BT. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:9754-9759.

Tang SS, Trackman PC, Kagan HM. Reaction of aortic lysyl oxidase with beta-aminopropionitrile. *J Biol. Chem.* 1983; 258:4331-4338.

Taylor MA, Amin JD, Kirschmann DA, Schiemann WP. Lysyl oxidase contributes to mechanotransduction-mediated regulation of transforming growth factor- β signaling in breast cancer cells. *Neoplasia.* 2011; 13:406-418. Trackman PC, Bedell-Hogan D, Tang J, Kagan HM. Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem.* 1992; 267:8666-8671.

Uno M, Oba-Shinjo SM, Silva Rd, Miura F, Clara CA, Almeida JR, Malheiros SM, Bianco AM, Brandt R, Ribas GC, Feres H, Dzik C, Rosenberg S, Stavale JN,

Teixeira MJ, Marie SK. IDH1 mutations in a Brazilian series of Glioblastoma. *Clinics*. 2011; 66:163-165.

Uzel MI, Scot IC, Babakhanlou-Chase H, Palamakumbura AH, Pappano WN, Hong HH, Greenspan DS, Trackman PC. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem*. 2001; 276:22537-22543.

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.

Van Den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJ, Wesseling P, Frenay M, Tijssen CC, Lacombe D, Idhah A, van Marion R, Kros JM, Dinjens WN, Gorlia T, Sanson M. 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; 16:1597-1604.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3:34-46.

Voloshenyuk TG, Hart AD, Khoutorova E, Gardner JD. TNF- α increases cardiac fibroblast lysyl oxidase expression through TGF- β and PI3Kinase signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011a; 413:370-375.

Voloshenyuk TG, Landesman ES, Khoutorova E, Hart AD, Gardner JD. Induction of cardiac fibroblast lysyl oxidase by TGF- β 1 requires PI3K/Akt, Smad3, and MAPK signaling. *Cytokine*. 2011b; 55:90-97.

Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995; 270:1230-1237.

Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol*. 2009; 174:1149-1153.

Weise JB, Rudolph P, Heiser A, Kruse ML, Hedderich J, Cordes C, Hoffmann M, Brant O, Ambrosch P, Csiszar K, Görögh T. LOXL4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in head and neck cancer. *Eur J Cancer*. 2008; 44:1323-1331.

Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, von Deimling A, Loeffler M. 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; 27:5743-5750.

Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol*. 2009; 27:5874-5880.

Wiel C, Augert A, Vincent DF, Gitenay D, Vindrieux D, Le Calvé B, Arfi V, Lallet-Daher H, Reynaud C, Treilleux I, Bartholin L, Lelievre E, Bernard D. Lysyl oxidase activity regulates oncogenic stress response and tumorigenesis. *Cell Death Dis*. 2013; 10:4:e855.

Wilgus ML, Borczuk AC, Stoopler M, Ginsburg M, Gorenstein L, Sonett JR, Powell CA. Lysyl oxidase: a lung adenocarcinoma biomarker of invasion and survival. *Cancer*. 2011; 117:2186-2191.

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; 121:279-281.

Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, Fraley SI, Wong CM, Khoo US, Ng IO, Wirtz D, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:16369-16374.

Wu G, Guo Z, Chang X, Kim MS, Nagpal JK, Liu J, Maki JM, Kivirikko KI, Ethier SP, Trink B, Sidransky D. LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer *Cancer Res*. 2007a; 67: 4123-4129.

Wu M, Min C, Wang X, Yu Z, Kirsch KH, Trackman PC, Sonenshein GE. Repression of BCL2 by the tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide inhibits transformed phenotype of lung and pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2007b; 67:6278-6285.

Xiao Q, Ge G. Lysyl oxidase, extracellular matrix remodeling and cancer metastasis. *Cancer Microenviron*. 2012; 3:261-273.

Xu X, Wang B, Xu Y. Expression of lysyl oxidase in human osteosarcoma and its clinical significance: a tumor suppressive role of LOX in human osteosarcoma cells. *Int J Oncol*. 2013 ;43:1578-1586.

Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL, Zhao SM, Xiong Y. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a

competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011; 19:17-30.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009; 360:765-773.

Yang X, Li S, Li W, Chen J, Xiao X, Wang Y, Yan G, Chen L. Inactivation of lysyl oxidase by β -aminopropionitrile inhibits hypoxia-induced invasion and migration of cervical cancer cells. *Oncol Rep*. 2013; 29:541-548

Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 2008; 14:818-829.

Yang X, Li S, Li W, Chen J, Xiao X, Wang Y, Yan G, Chen L. Inactivation of lysyl oxidase by β -aminopropionitrile inhibits hypoxia-induced invasion and migration of cervical cancer cells. *Oncol Rep*. 2013; 29:541-548.

Yoon JH, Park JK, Kang YH, Park YK, Nam SW, Lee JY, Park WS. Lysyl oxidase G473A polymorphism is closely associated with susceptibility to gastric cancer in a South Korean population. *APMIS*. 2011; 119:762-768.

Young AN, Amin MB, Moreno CS, Lim SD, Cohen C, Petros JA, Marshall FF, Neish AS. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am J Pathol*. 2001; 158:1639-1651.

Yu Z, Sato S, Trackman PC, Kirsch KH, Sonenshein GE. Blimp1 activation by AP-1 in human lung cancer cells promotes a migratory phenotype and is inhibited by the lysyl oxidase propeptide. *PLoS One*. 2012; 7:e33287.

Zaffryar-Eilot S, Marshall D, Voloshin T, Bar-Zion A, Spangler R, Kessler O, Ghermazien H, Brekhman V, Suss-Toby E, Adam D, Shaked Y, Smith V, Neufeld G. Lysyl oxidase-like-2 promotes tumour angiogenesis and is a potential therapeutic target in angiogenic tumours. *Carcinogenesis*. 2013; 34:2370-2379.

Zhang Q, Jin XS, Yang ZY, Wei M, Zhu XC, Wang P, Liu BY, Gu QL. Upregulated expression of LOX is a novel independent prognostic marker of worse outcome in gastric cancer patients after curative surgery. *Oncol Lett*. 2013; 5:896-902.

Zhan P, Shen XK, Qian Q, Zhu JP, Zhang Y, Xie HY, Xu CH, Hao KK, Hu W, Xia N, Lu GJ, Yu LK. Down-regulation of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) is associated with disease progression in lung adenocarcinomas. *Med Oncol*. 2012; 29:648-655.

Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, Xiong Y. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science*. 2009a; 324:261-265.

Zhao Y, Min C, Vora SR, Trackman PC, Sonenshein GE, Kirsch KH. The lysyl oxidase pro-peptide attenuates fibronectin-mediated activation of focal adhesion kinase and p130Cas in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2009b; 284:1385-1393 (a).

Zheng Y, Wang X, Wang H, Yan W, Zhang Q, Chang X. Expression of the lysyl oxidase propeptide in hepatocellular carcinoma and its clinical relevance. *Oncol Rep*. 2014; 31:1669-1676.

Zhang C, Moore LM, Li X, Yung WK, Zhang W. IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro Oncol*. 2013;15:1114-1126.

Apêndice

Zimbra

roselis@usp.br

Submission Confirmation for LOX expression and functional analysis in astrocytomas and impact of IDH1 mutation - [EMID:c0631e4589d31df2]

De : PLOS ONE <no-reply@editorialmanager.com>

Qua, 23 de Jul de 2014 12:17

Remetente : em pone 0 3ca56c 0132fd1d
<em.pone.0.3ca56c.0132fd1d@editorialmanager.com>

Assunto : Submission Confirmation for LOX expression and functional analysis in astrocytomas and impact of IDH1 mutation - [EMID:c0631e4589d31df2]

Para : Roseli da Silva <roselis@usp.br>

Responder para : PLOS ONE <plosone@plos.org>

PONE-D-14-33033

LOX expression and functional analysis in astrocytomas and impact of IDH1 mutation

PLOS ONE

Dear Dr da Silva,

Thank you for submitting your manuscript entitled "LOX expression and functional analysis in astrocytomas and impact of IDH1 mutation" to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-14-33033.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://pone.edmgr.com/>.

Please visit EveryONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community blog for our published authors and readers, to find out what the journal is thinking, changing and doing.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,
PLOS ONE

July 21, 2014

Dear Editor,

We would like to submit the manuscript entitled "LOX expression and functional analysis in astrocytomas and impact of *IDH1* mutation" for your consideration to be published in PLoS ONE as a Research Article.

In the present study, we analyzed *LOX*, *BMP1* and *HIF1A* transcript expression levels in a series of 153 astrocytomas. The results demonstrated that increased expression of all three genes positively correlated with the malignant grade of astrocytomas. LOX protein expression also increased according to the degree of malignancy, with localization in the cytoplasm and nucleus and staining observed in endothelial cells. Mutation status of *IDH1* was also evaluated, and glioblastoma cases with *IDH1* mutation expressed lower levels of LOX in the nucleus, and *IDH1*-mutated cases showed lower *LOX* expression levels when compared to wild-type *IDH1* cases. *LOX* knockdown and inhibition by BAPN in glioblastoma cell lines affected migration, invasion and soft agar colony formation. Taken together, our results show that *LOX* expression is influenced by *IDH1* mutational status, providing new insights for LOX target therapies to control astrocytomas.

The authors certify that the work submitted herewith is in full accordance with the editorial policy and ethical considerations. We certify that the manuscript has not been published previously.

Thank you very much for your attention on this matter. We hope the manuscript meets the high standards of your journal. We are looking forward to hearing from you in a near future.

Sincerely yours,

Roseli da Silva
Department of Neurology
School of Medicine of University of São Paulo
São Paulo – Brazil
E-mail: roselis@usp.br
Phone: +55-11-3061-8310

PLOS ONE

LOX expression and functional analysis in astrocytomas and impact of IDH1 mutation --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-14-33033
Article Type:	Research Article
Full Title:	LOX expression and functional analysis in astrocytomas and impact of IDH1 mutation
Short Title:	LOX expression in astrocytomas
Corresponding Author:	Roseli da Silva, Ph.D. student University of Sao Paulo São Paulo, São Paulo BRAZIL
Keywords:	LOX; IDH1; BMP1; HIF1; Astrocytomas
Abstract:	<p>Lysyl oxidase (LOX) is involved in vital biological processes such as cell motility, cell signaling and gene regulation. Deregulation of this protein can contribute to tumor formation and progression. Although it is known that LOX is involved in invasion, proliferation and tumor migration in other types of tumors, studies of LOX in astrocytomas of different grades are scarce. The purpose of our study was to characterize LOX, BMP1 and HIF1A expression by real-time PCR in astrocytomas with WHO grades I to IV compared to non-neoplastic brain tissue. IDH1 mutational status was determined by PCR and sequencing. LOX protein expression was also analyzed by immunohistochemistry. LOX functional analyses were performed using siRNA knockdown and the specific inhibitor BAPN in two glioblastoma cell lines. The expression levels of LOX, BMP1 and HIF1A were correlated and analyzed according to IDH1 mutation status and to the clinical end-point of overall survival of glioblastoma patients. The results demonstrate that increased expression and activity of LOX, BMP1 and HIF1A were positively correlated with the malignant grade of astrocytomas. LOX protein expression also increased according to the degree of malignancy, with localization in the cytoplasm and nucleus and staining observed in endothelial cells. Glioblastoma with a mutation in IDH1 expressed lower levels of LOX in the nucleus, and IDH1-mutated cases showed lower LOX expression levels when compared to wild-type IDH1 cases. LOX knockdown and inhibition by BAPN in U87MG and A172 cell lines affected migration, invasion and soft agar colony formation. Taken together, these results corroborate the role of LOX in the migration, invasion and angiogenesis of astrocytomas. Furthermore, LOX expression is influenced by IDH1 mutational status. This work provides new insights for researchers aiming to design targeted therapies to control astrocytomas.</p>
Order of Authors:	Roseli da Silva, Ph.D. student Miyuki Uno Suely Kazue Nagahashi Marie Sueli Mieko Oba-Shinjo
Suggested Reviewers:	Chetan Bettgowda, Assistant Professor of Neurosurgery and Oncology Professor, Johns Hopkins University School of Medicine cbetteg1@jhmi.edu The line of research is Central Nervous System Tumors Akiko Mammoto, M.D. Ph.D. Ph.D., Hospital and Harvard Medical School akiko.mammoto@childrens.harvard.edu She studies LOX protein and gene
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	none

LOX expression and functional analysis in astrocytomas and impact of *IDH1* mutation

Roseli da Silva¹; Miyuki Uno²; Suely K. Nagahashi Marie^{1,3}, and Sueli M. Oba-Shinjo¹

¹Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Department of Neurology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 01246-903, Brazil

²Center of Translational Research in Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), 01246-000, São Paulo, Brazil

³Center for Studies of Cellular and Molecular Therapy (NETCEM), University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Corresponding author

Roseli da Silva

Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Department of Neurology, School of Medicine, University of São Paulo, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil

Phone: +55-11-3061-8310

Fax: +55-11-3061-7471

e-mail: roselis@usp.br

Abstract

Lysyl oxidase (LOX) is involved in vital biological processes such as cell motility, cell signaling and gene regulation. Deregulation of this protein can contribute to tumor formation and progression. Although it is known that LOX is involved in invasion, proliferation and tumor migration in other types of tumors, studies of LOX in astrocytomas of different grades are scarce. The purpose of our study was to characterize *LOX*, *BMP1* and *HIF1A* expression by real-time PCR in astrocytomas with WHO grades I to IV compared to non-neoplastic brain tissue. *IDH1* mutational status was determined by PCR and sequencing. LOX protein expression was also analyzed by immunohistochemistry. LOX functional analyses were performed using siRNA knockdown and the specific inhibitor BAPN in two glioblastoma cell lines. The expression levels of *LOX*, *BMP1* and *HIF1A* were correlated and analyzed according to *IDH1* mutation status and to the clinical end-point of overall survival of glioblastoma patients. The results demonstrate that increased expression and activity of *LOX*, *BMP1* and *HIF1A* were positively correlated with the malignant grade of astrocytomas. LOX protein expression also increased according to the degree of malignancy, with localization in the cytoplasm and nucleus and staining observed in endothelial cells. Glioblastoma with a mutation in *IDH1* expressed lower levels of LOX in the nucleus, and *IDH1*-mutated cases showed lower *LOX* expression levels when compared to wild-type *IDH1* cases. *LOX* knockdown and inhibition by BAPN in U87MG and A172 cell lines affected migration, invasion and soft agar colony formation. Taken together, these results corroborate the role of LOX in the migration, invasion and angiogenesis of astrocytomas. Furthermore, *LOX* expression is influenced by *IDH1* mutational status. This work provides new insights for researchers aiming to design targeted therapies to control astrocytomas.

Keywords:

LOX; IDH1; BMP1; HIF1; Astrocytomas

Introduction

Astrocytomas are the most common primary brain tumors. The World Health Organization (WHO) classifies astrocytomas into four malignant grades: grade I, or pilocytic astrocytoma; grade II, or low-grade astrocytoma (AGII), grade III, or anaplastic astrocytoma (AGIII); and grade IV astrocytoma or glioblastoma (AGIV or GBM) [1] (). Diffusely infiltrative astrocytomas (AGII-GBM) have the ability to invade the surrounding normal brain tissue, hampering tumor resection. GBM, the most malignant and frequent brain tumor in adults, can be divided into two subgroups: primary GBM, which arises *de novo*, and secondary GBM, which results from the progression of a lower grade astrocytoma [2,3]. Interestingly, mutations in the gene that encodes isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) have been reported in diffuse gliomas, including WHO grades II and III astroglial and oligodendroglial lineages [4-8]. *IDH1* mutations are strong predictors of a more favorable prognosis and serve as a highly selective molecular marker of secondary GBM that complements clinical criteria for distinguishing secondary GBM from primary GBM [9,10,11].

Lysyl oxidase (LOX), a copper-dependent amine oxidase, catalyzes the enzymatic stage of collagen and elastin cross-linking by oxidizing primary amines into reactive aldehydes. These reactions are essential for stabilization of collagen fibrils and for the integrity and elasticity of mature elastin to ensure normal functionality of connective tissue, embryonic development and adult tissue remodeling) [12]. Importantly, biologically active compounds, hydrogen peroxide and ammonia are generated as by-products during these catalytic reactions. LOX also has intracellular functions and is involved in the regulation of cell differentiation, motility/migration and gene transcription. Aberrant expression of the *LOX* gene has been reported in multiple tumors) [13].

LOX is synthesized by several cell types as a 48 kDa protein. After signal peptide cleavage and N-glycosylation, the resulting 50 kDa proenzyme is secreted and converted into a mature, active 30 kDa form as a result of proteolytic processing by procollagen C proteinase/bone morphogenic protein-1 (BMP1). The catalytic activity of *LOX* can be specifically and irreversibly inhibited by beta-aminopropionitrile (BAPN) [14]. LOX has been identified as an important regulator of the hypoxia-induced tumor progression pathway through a HIF-1 α -dependent mechanism in numerous cancer types, such as breast, head and neck, prostate and renal cell carcinomas [15,16,17]. LOX is involved in the hypoxic upregulation of *HIF1A*, and LOX and HIF-1 α potentiate each other to foster

tumor progression in the colon through the PI3K-Akt signaling pathway [15,], [18]. Secreted LOX is responsible for the invasive properties of hypoxic cancer cells, including astrocytomas, through the activation of focal adhesion kinase (FAK)/paxillin [19]. LOX has been implicated in tumor angiogenesis *in vitro* and *in vivo* by increasing vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and secretion as well as blood vessel formation [20].

Recently, it was demonstrated that HIF-1 α -responsive genes essential for cell growth, including *LOX*, were underexpressed in gliomas with *IDH1* mutation [21]. Therefore, we aimed to investigate *LOX*, *BMP1* and *HIF1A* mRNA expression levels in a large series of astrocytomas of different malignant grades and compare these results between cases with wild type *IDH1* and cases with mutated *IDH1*. *LOX* knockdown by siRNA was performed for functional studies *in vitro*, and LOX protein was also analyzed in tumor samples. These data suggest that *LOX* expression increases according to malignancy grade in astrocytomas and represents a potential therapeutic target, especially for cases without *IDH1* mutation.

Methods

Tissue Samples

The samples used in this study consisted of 153 astrocytomas (grades I to IV). Tumors were graded according to the WHO classification into AGI (n=23; mean age at diagnosis, 19.4 $\pm$ 9.7 years; 14 males and 9 females), AGII (n=26; mean age at diagnosis, 34.0 $\pm$ 8.1 years; 15 males and 11 females), AGIII (n=18; mean age at diagnosis, 35.0 $\pm$ 12.3 years; 11 males and 7 females) and GBM (n=86; mean age at diagnosis, 54.0 $\pm$ 13.9 years; 58 males and 28 females). The non-neoplastic control group consisted of samples from individuals undergoing temporal lobe resection during epilepsy surgery (n=22; mean age at diagnosis, 38.0 $\pm$ 7.6 years; 10 males and 12 females). All samples were collected during surgical procedures by the Neurosurgery Group of the Department of Neurology at the Hospital das Clinicas of School of Medicine, University of Sao Paulo, Brazil. Fresh surgical samples were immediately snap-frozen in liquid nitrogen upon surgical removal. Before RNA extraction, a 4- μ m-thick cryosection of each sample was stained with hematoxylin, and necrotic and non-neoplastic areas were removed from the frozen block

of tumoral tissue by microdissection. Grey matter was avoided in the control non-neoplastic samples. Written informed consent was obtained from all patients according to the ethical guidelines approved by the Ethics Committee of the School of Medicine, University of São Paulo (0600/10). The Ethical Commission for Research Projects Analysis (CAPPesq) from the Clinical Board of Hospital das Clínicas and School of Medicine, University of São Paulo, in council session taken place at 2012, August 8th, approved the research protocol entitled: “Expression and role of lysyl oxidase family genes in astrocytomas”, presented by the Department of Neurology.

Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from frozen tissues (tumor and non-neoplastic) using an RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA concentration and purity were evaluated by measuring the absorbance at 260 and 280 nm. A 260/280 ratio ranging from 1.8 to 2.0 was considered satisfactory purity. Denaturing agarose gel electrophoresis was used to assess the quality of the samples. A conventional reverse transcription reaction was performed to yield single-stranded cDNA. First-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA that was previously treated with 1 unit of DNase I (FPLC-pure, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using random and oligo(dT) primers, RNase inhibitor, and SuperScript III reverse transcriptase according to the manufacturer’s recommendations (Life Technologies, Carlsbad, CA). The resulting cDNA was subsequently treated with 1 unit of RNase H (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), diluted with TE buffer, and stored at -20°C until later use.

Quantitative real time PCR (RT-qPCR)

The relative expression levels of *LOX*, *HIF1A* and *BMP1* were analyzed by RT-qPCR using the SYBR Green approach. Quantitative data were normalized to the geometric mean of three reference genes suitable for the analysis: hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*), beta glucuronidase (*GUSB*) and TATA box binding protein (*TBP*). The primer sequences were as follows (from 5’ to 3’): *LOX* F: CCTACTACATCCAGGCGTCCA; *LOX* F: CATAATCTCTGACATCTGCCCCTGT; *LOX* R: CATCCAAGAAGCCCTAACGTGT; *HIF1A* F: CATTTCGCTTTCTCTGAGCAT;

BMP1 F: CTCGTAAGTCCTCCATCAAAGCT; BMP1 R: CTCTCCATCTCCCACAGGCTC; HPRT F: TGAGGATTTGGAAAGGGTGT; HPRT R: GAGCACACAGAGGGCTACA; GUSB F: GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT, GUSB R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA; TBP F: AGGATAAGAGAGCCACGAACCA, TBP R: CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT. The primers were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). The minimum primer concentrations necessary were determined to give the lowest threshold cycle (Ct) and maximum amplification efficiency while minimizing non-specific amplification. The primer concentrations used were 200 nM for *LOX*, *HIF1A*, *BMP1*, *HPRT* and *TBP* and 400 nM for *GUSB*. Standard curves were established to ensure amplification efficiency, and an analysis of melting curves demonstrated a single peak for all PCR products. Additionally, agarose gel electrophoresis was employed to check the size of the PCR products amplified. SYBR Green I amplification mixtures (12 µl) contained 3 µl of cDNA, 6 µl of 2x Power SYBR Green I Master Mix (Life Technologies) and primers. The PCRs were run on an ABI Prism 7500 sequence detector (Life Technologies) as follows: 2 min at 50°C, 10 min of polymerase activation at 95°C, and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Quantitative data were normalized relative to the internal housekeeping control genes. The equation $2^{-\Delta C_t}$ was applied to calculate the expression of *LOX*, where $\Delta C_t = C_t$ of the target gene – geometric mean of the C_t of the reference genes [22]. The RT-qPCR reactions were performed in duplicate for each sample and repeated when the C_t values were not similar. The results are presented on a log₁₀ scale for better visualization. *LOX* expression was scored according to the median expression values of each astrocytoma grade. For statistical analysis, scores equal to or higher than the median values were defined as *LOX* overexpression. For functional analysis of *LOX* knockdown after siRNA transfection, the same procedures were followed, except that only *HPRT* was used as a reference gene. The expression values were calculated relative to the scrambled non-target control (NTC).

DNA extraction and IDH1 mutational analyses

DNA was extracted from frozen tumor samples using a QiaAmp DNA Micro kit (Qiagen). Polymerase chain reaction (PCR) followed by DNA sequencing was applied to detect mutations in IDH1, as previously described [23]. The sequences of primers (5'-3') synthesized by IDT for PCR amplification of exon 4 were as follows: CCATCACTGCAGTTGTAGGTT and CATACAAGTTGGAAATTTCTGG. PCR products were generated in a 25 μ L reaction mixture including 100 ng of DNA, 50 mM KCl, 50 mM 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). 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) were purified with a GFX column (GE Healthcare) and sequenced on an ABI Prism 3130 DNA automated sequencer using the Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 (Life Technologies). The primers used for sequencing were the same as those used for PCR.

Cell culture conditions and transient transfection

The human malignant astrocytoma cell lines U87MG and A172 were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies), 100 IU/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin in an atmosphere consisting of 5% CO₂ in air at 37°C in a humidified incubator. Dicer substrate small interfering RNA (siRNA) duplexes for *LOX* knockdown (5'-GUAAUUACAGAAUUGAAACACUGUGUU-3') were diluted in buffer according to the manufacturer's recommendations (IDT). U87MG and A172 cells (1×10^5 cells/well) were seeded in a six-well plate; after 24 h, they were transfected with Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies). Control cells were transfected with a scrambled non-target control (NTC) siRNA from IDT. siRNAs for both *LOX* and NCT were used at a concentration of 1 nM, and *LOX* knockdown as well as the effect of *LOX* silencing were evaluated at 2, 4, and 7 days after transfection by RT-qPCR and Western blotting.

Cell migration and invasion assay

The migration and invasion abilities of the cells were assessed by determining the ability of the cell lines to cross a membrane with a pore size of 8 μm in non-coated (for migration) and matrigel-coated (for invasion) Transwells (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), according to the manufacturer's recommendations. After 48 hours of transfection, the cells were maintained in DMEM supplemented with 1% FBS for 2 hours. To determine the effect of LOX inhibitor treatment on migration, the cells were treated with 100 mM β -aminopropionitrile (BAPN Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) for 24 h prior to the migration assays and for an additional 4 h during the assay. This concentration of BAPN has no cytotoxic effects, as demonstrated previously [24]. After trypsinization, a total of 2.5×10^4 cells were suspended in 0.5 ml DMEM with 1% FBS and added to the upper compartment of the Transwell. The bottom chamber contained 10% FBS, and the cells were incubated for 18 hours at 37°C in an atmosphere containing 5% CO_2 . Non-migrating and non-invading cells were wiped away from the upper surface of the membrane with a cotton swab. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with 0.2% crystal violet (Sigma-Aldrich) in 20% methanol, and analyzed by inverted microscopy (40x magnification). The results of the migration and invasion assays were quantified by counting 18 random fields from each of the experimental inserts in duplicate. Data were generated from two independent experiments. Migration values were expressed as the average number of migrated cells per microscope field.

Cell proliferation and anchorage-independent cell growth assay

Proliferation of U87MG and A172 cells was evaluated after 2, 4, and 7 days of siRNA *LOX* transfection in duplicate experiments. The cells were stained with Trypan blue and counted using an automatic counter (Countess, Life Technologies) for determination of live cells. Anchorage-independent cell growth was analyzed via a soft agar colony formation assay. Two days after transfection, 1×10^3 cells were resuspended in 0.3% agar on a layer of 0.6% agar in DMEM (1x) in a six-well plate and incubated in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO_2 at 37°C. After 10 days, the colonies were fixed with formaldehyde and stained with 0.005% crystal violet in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h. The number of colonies was recorded for each well. Two independent experiments were performed in duplicate.

Western blot analysis

After transfection with control siRNA (NTC) and siRNA specific for *LOX*, total protein lysates were prepared from cell cultures with RIPA lysis buffer and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) on ice. The protein concentration was determined using the Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The absorbance was measured at 595 nm using a microplate spectrophotometer (Multiskan Spectrum; Thermo Labsystems, Helsinki, Finland). All assays were conducted in duplicate, and calculations were carried out with a standard curve constructed using different concentrations of bovine serum albumin (2 mg/ml to 0.125 mg/ml). Total protein lysates (30 mg) were separated by 12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (TGX Mini Protean, Bio-Rad) with Tris-glycine running buffer. The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using the iBlot dry blotting system (Life Technologies). The membrane was blocked with 5% skim milk and incubated with rabbit polyclonal primary anti-LOX diluted 1:1,000 (Sigma-Aldrich). The membrane was also incubated with mouse monoclonal anti- β -actin (1:5,000, clone AC-74, Sigma-Aldrich) as a protein loading control. The secondary antibodies used were anti-rabbit (1:1,000) and anti-mouse IgG (1:5,000) conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich). The immune complexes were visualized using enhanced chemiluminescence reagent (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer, Waltham, MA) and detected with ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

Immunohistochemistry

For immunohistochemical detection, tissue sections were routinely processed and subjected to antigen retrieval. Briefly, slides were immersed in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) and incubated at 122°C for 3 min using an electric pressure cooker (BioCare Medical, Walnut Creek, CA). Specimens were then blocked and further incubated with a polyclonal antibody raised in rabbits against human LOX (ab31238, 1:100 dilution; Abcam, Cambridge, UK) at 16–20°C for 16 hours. The reaction was developed with a commercial kit (Novolink; Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK) at room temperature using diaminobenzidine and Harris hematoxylin for nuclear staining. Optimization using a positive control suggested by the manufacturer (breast carcinoma) was performed to obtain the optimal dilution. The staining intensity of tissue sections was evaluated independently by two observers (SKNM and RS). A semi-quantitative scoring system

considering both the 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%. The LOX immunohistochemistry labeling score (ILS) was obtained by determining the product of the staining intensity and the percentage of cells stained. Digital photomicrographs of representative fields were captured and processed using Picasa 3 (Google, USA).

Statistical analysis

Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk normality tests were used to analyze the distribution of data. For analysis of the differences in gene expression between non-neoplastic tissues and astrocytomas of different grades of malignancy, the non-parametric Dunn test was used in all cases. Coexpression of genes was analyzed using the Spearman-rho test. A correlation coefficient (r) of ≥ 0.7 was interpreted as a strong correlation, $0.3 \leq r < 0.7$ was interpreted as a moderate correlation, and $r < 0.3$ was interpreted as a slight correlation. The Mann-Whitney test and t test were used to compare *IDH1* mutational status and gene expression for non-parametric and parametric distributions, respectively. The Mann-Whitney test was also used for functional assays. The Kruskal-Wallis test was used for ILS analysis among the different tissues. The Kaplan-Meier survival curves were analyzed using the log rank test (Mantel Cox), excluding 9 cases of tumor relapse in GBM patients. To perform the analysis, the patients were divided into two groups characterized by high (above the median) and low (below the median) gene expression. The statistical significance was set at $p < 0.05$. All analyses were performed using SPSS version 15.0 (Chicago, IL), and scatter plots were constructed using the program GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Results

LOX, *BMP1* and *HIF1A* Expression Levels in Astrocytomas of Different Malignant Grades

LOX, *BMP1* and *HIF1A* expression analysis by RT-qPCR showed great variability in astrocytomas of all malignant grades when compared to non-neoplastic samples. The GBM cases had higher *LOX* expression levels relative to non-neoplastic cases, with a statistically significant difference (Figure 1A). On the other hand, *BMP1* expression levels were significantly higher in AGI and GBM groups when compared to non-neoplastic samples (Figure 1B). *HIF1A* expression levels increased with the malignant grade of astrocytomas, with statistically significant values for all malignant grades of astrocytomas when compared to control samples (Figure 1C). Coexpression of the three genes was compared for astrocytomas of all malignant grades (Figure 2). Interestingly, Spearman analysis demonstrated that *LOX* mRNA levels were positively correlated with *BMP1* and *HIF1A* in GBM ($r=0.217$ and $p=0.045$, Figure 2J; $r=0.367$ and $p=0.001$, Figure 2K, respectively). *BMP1* expression also presented a positive correlation with *HIF1A* in GBM ($r=0.389$; $p<0.001$) (Figure 2L) and in AGI ($r=0.477$; $p=0.033$) (Figure 2C). *LOX*, *BMP1* and *HIF1A* expression levels were correlated with the clinical outcome of the GBM cases. The analysis of overall survival of GBM cases with high and low expression did not reveal a significant correlation between the gene expression data and the prognosis of GBM patients.

Association of *LOX*, *BMP1*, and *HIF1A* mRNA Expression Levels and *IDH1* Mutation Status

The frequency of *IDH1* mutation was 80.8% in AGII (21 out of 26), 61.1% in AGIII (11 out of 18) and 12.8% in GBM (11 out of 86) (Figure 1, red lozenges and Table 1), which was also described in our previous study of the frequency of *IDH1* mutations in a series of GBM patients [23]. Our GBM cases were composed mainly by primary GBMs, which explains the low frequency of *IDH1* mutation. Of all the mutations, R132H was the most common in glioma. Table 1 summarizes the comparison of the median expression levels of cases with wild-type and mutated *IDH1*. *IDH1*-mutated AGII and GBM cases showed lower *LOX* expression levels when compared to wild-type *IDH1* AGII ($p=0.049$) and GBM ($p=0.008$) cases. On the other hand, AGIII cases with wild-type *IDH1* presented lower *HIF1A* expression levels when compared to

IDH1-mutated cases. ($p=0.038$). No difference was found for *LOX* expression in AGIII groups with mutated and wild type *IDH1*. Similarly, *BMP1* expression between wild-type and mutated *IDH1* cases was not different regardless of astrocytoma group, and *HIF1A* expression was not different for AGII and GBM.

Effect of *LOX* Knockdown in GBM Cells

LOX knockdown was evaluated after 2 days of transfection of U87MG and A172 GBM cell lines with siRNA targeted against *LOX* or non-targeted control (NTC) siRNA. The efficiency of transfection was analyzed by RT-qPCR (Figure 3A) and western blotting (Figure 3B) for each of the duplicate experiments. Both cell lines presented an approximate 80% decrease in *LOX* mRNA expression when compared to NTC. Protein expression was also confirmed to be diminished after *LOX* knockdown with siRNA.

Transfected cells were maintained under cell culture conditions for 2, 4 and 7 days after transfection to evaluate the involvement of *LOX* in the proliferation of A172 and U87MG cells. There was no difference in the proliferation rate of cells after *LOX* knockdown when compared to NTC in both cell lines analyzed (data not shown). To test the hypothesis that *LOX* expression was correlated with the migratory ability of tumor cells, U87MG and A172 cell lines were evaluated after knocking down *LOX* expression by siRNA and after inhibiting the active form of *LOX* with a specific drug (BAPN). There was a reduction in the migration ability of U87MG and A172 cells after either transfection with siRNA for *LOX* or treatment with BAPN, as shown in Figure 3C and 3D. The differences between the *LOX* siRNA and NTC groups were statistically significant in both U87MG ($p<0.001$) and A172 ($p<0.0001$) cells. Inhibition of *LOX* by BAPN significantly inhibited the migration of both U87MG and A172 cells when compared to non-treated cells ($p<0.0001$ for both cell lines). *LOX* involvement in the invasion of GBM cell lines was also observed for U87MG and A172 cells (Figure 4B) ($p<0.0001$ for both).

Anchorage-independent growth assays were subsequently used to examine the role of *LOX* in the colony formation ability of U87MG and A172 cells. No reduction in colony numbers was observed for U87MG cells after knockdown of *LOX* when compared to NTC (Figure 4C). On the other hand, there was a significant decrease in the number of colonies of A172 cells transfected with *LOX* RNAi compared to NTC ($p<0.0001$) (Figure 4D).

LOX Immunohistochemistry Analyses

Expression of LOX at the protein level was investigated by immunohistochemistry of non-neoplastic brain tissues and astrocytomas of different malignant grades, as shown in Figure 5. LOX expression was observed in the cytoplasm and nucleus of all tissues with variable intensity. Endothelial cells were stained specifically in neoformed vessels of GBM cases. The immunohistochemistry results were analyzed semi-quantitatively by the ILS, as described in Methods. The cytoplasmic ILS did not vary significantly among the different astrocytoma groups and control samples (Figure 6A). Nevertheless, a high nuclear ILS was found in non-neoplastic samples, with staining of glial cells and neurons, while the nuclear ILS in astrocytomas increased with increasing degree of malignancy (Figure 6B). Additionally, endothelial cells were predominantly stained for LOX in GBM cases (Figure 6C). Interestingly, GBM cases with mutated *IDH1* presented lower LOX nuclear and endothelial staining, confirming the results of *LOX* transcript expression and *IDH1* mutation status analyses.

Discussion

In the present study, we investigated the expression of *LOX*, *BMP1* and *HIF1A* in astrocytomas of different malignant grades. Additionally, the effect of *IDH1* mutation on gene expression was also evaluated as well as the role of *LOX* in the behavior of GBM cell lines.

LOX is a secreted amine oxidase that plays a key role in modifying the primary tumor microenvironment by crosslinking collagens and elastin in the ECM [15,25] thereby causing stiffening of the matrix and enhancing the invasive and metastatic properties of the tumor [24, 26, 27, 28]. The stiffness of the ECM is particularly enhanced by the active form of LOX ([15,29], and BMP1 is responsible for processing LOX into the active form [30].

We demonstrated significantly higher *LOX* mRNA expression levels in astrocytomas when compared to non-neoplastic brain tissue samples, most notably in GBM cases, as reported by others in different types of tumors [31-35]. Furthermore, higher *BMP1* expression that was positively correlated with *LOX* expression was also detected in GBM cases. Such findings are in agreement with the fact that GBMs are the most malignant and invasive astrocytomas. In fact, we used functional analysis to demonstrate that

knocking down *LOX* with siRNA or inhibiting *LOX* with BAPN led to a reduction in the migration and invasion of U87MG and A172 GBM cell lines. Similar results were obtained by Lackzo et al. (2007) [19] using other GBM cells (U251 and U373) treated with BAPN and catalase. These authors associated the role of active *LOX* in the migration/invasiveness of GBM cell lines with FAK/paxillin activation through hydrogen peroxide generated by *LOX* catalytic reactions. Intracellular hydrogen peroxide in excess can facilitate the phosphorylation and activation of Src, which then phosphorylates FAK, with consequent induction of various signaling pathways involved in the regulation of cell adhesion and migration [36]. FAK phosphorylation may also explain our finding of a decrease in the number of colonies of A172 cells in which *LOX* expression was knocked down, as suggested by others) [33]. The absence of a similar effect in the colony formation assay with U87MG cells corroborates the heterogeneity observed in this type of tumor.

The irreversible *LOX* inhibitor BAPN was initially used to treat disorders such as hypertension [37], decreased wound healing [38], and peripheral blood mononuclear cell chemotaxis [39] by preventing the formation of a highly cross-linked form of vascular collagen. Later, BAPN was proposed to also be useful in the treatment of cancers with *LOX* hyperexpression, such as melanoma [40,41], head and neck carcinoma [42,43] and breast carcinoma [33,44]. Recently, BAPN was used in the treatment of *in vivo* tumor models of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice, and it was able to stabilize senescence, delay tumorigenesis, and increase survival [45]. Similarly, another inhibitor of *LOX*, magnolol, presented a similar effect in a breast cancer model *in vitro* [33]. In addition to BAPN, d-penicillamine, which depletes intracerebral copper, also exhibited antiangiogenic effects on GBM tumor growth in mice [46]. *LOX* is essential for stimulating endothelial cells and angiogenesis by increasing VEGF expression [20], and the increase in matrix stiffness also upregulates VEGF expression [47]. Interestingly, *LOX* is expressed in GBM endothelial cells, as demonstrated by immunohistochemistry. This result corroborates a recent report of *LOX* expression in tumor endothelial cells [41]. The expression of *LOX* by tumoral and endothelial cells in GBM may be controlled by a positive feedback loop mechanism, although this will require further investigation. Taken together, these results reinforce the notion that *LOX* may be a target in the treatment of tumors.

The high proliferative capacity of GBM leads to the development of hypoxic areas and ultimately necrosis. The reduction in oxygen availability activates hypoxia-inducible factor-1, which in turn activates the transcription of target genes, including *LOX* [15, 48]. Indeed, our results demonstrated that *HIF1A* is highly expressed in GBM cases, and its expression is associated with *LOX* and *BMP1* expression. Interestingly, the median expression levels of both *LOX* and *BMP1* were higher in AGI samples than in AGII samples. In contrast, the median expression of *HIF1A* in AGI cases was lower than that in AGII. AGI is non-invasive tumor, while AGII is infiltrative. Additionally, AGI presents vascular proliferation and shows greater contrast on neuroimaging compared to AGII. Taking these phenotypic characteristics together, we speculate that *HIF1A* upregulation in AGI activates a hypoxia-driven angiogenic pathway [49]. Additionally, *BMP1* can activate various other substrates that are important regulators of extracellular matrix production and quality as well as of antiangiogenic responses by producing a factor from the basal membrane compound [50,53]. In contrast, stepwise upregulation of *HIF1A* associated with high expression of *LOX* and *BMP1* progressively activates both angiogenic and invasive pathways in diffusively infiltrative astrocytomas (grades II to IV).

Another interesting finding of the present study was the association of *IDH1* mutation with low expression of *LOX*. A list of underexpressed genes responsive to HIF-1 α , including *LOX*, has been recently reported in *IDH1* mutant gliomas and brain tumor stem cells [21]. In fact, in the present series, *LOX* expression was significantly lower among AGII (p=0.049) and GBM (p=0.008) cases presenting *IDH1* mutations when compared to cases with wild-type *IDH1*. For GBM, a decreased level of *LOX* immunostaining in the nucleus was observed with the presence of *IDH1* mutations. Mutated *IDH1* is a common feature in lower grade gliomas and secondary GBMs [5,7,54,55]. Our series of GBM consisted mainly of secondary cases, as previously reported [56,57]. The presence of mutated *IDH1* is strongly correlated with a CpG island methylator phenotype in gliomas [58]. Therefore, promoter methylation might explain the decreased *LOX* expression in the presence of such a mutation. Indeed, *LOX* inactivation by methylation has already been demonstrated in gastric cancers as well as colon, lung and ovarian cancer cell lines [59].

Using an antibody against the C-terminus of *LOX* that detects only the 50 kDa pro-*LOX* or the processed active 32 kDa *LOX*, we have unequivocally detected a high level of *LOX* nuclear staining, particularly in the most malignant astrocytomas (grades III and IV).

Previous studies have described only intense perinuclear and cytoplasmic staining of astrocytomas of different malignant grades; nuclear staining has not been mentioned [19]. Intriguingly, nuclear staining was also detected in our normal controls, including glial and neuronal cells, as described by others [06]. These findings were in agreement with previous reports of LOX nuclear localization in smooth muscle [61, 62] and proliferating cells [63]. LOX can oxidize nuclear proteins such as histone H1 [64], leading to epigenetic effects on DNA-histone and histone-histone interactions, with consequent effects on DNA transcription analogous to the effects resulting from histone acetylation [65]. Further studies are needed to clarify differential LOX function in normal and tumor tissues as well as in distinct intracellular compartments.

In summary, our results confirmed that LOX plays an important role in migration and angiogenesis in diffusively infiltrative astrocytomas, especially GBMs. Moreover, *LOX* expression is influenced by *IDH1* mutational status, which provides new insights for the design of targeted therapies to control these tumors.

Acknowledgements

We are very thankful for all the neurosurgeons of the Division of Neurosurgery of the Department of Neurology at Hospital das Clínicas of School of Medicine, University of São Paulo for the therapeutic and follow-up procedures of all patients included in this study. We particularly acknowledge Thais F. Galatro for the valuable immunohistochemistry reactions. This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant #04/12133-6), the Ludwig Institute for Cancer Research, National *Council* for Scientific and Technological Development (CNPq), and Fundação Faculdade de Medicina (FFM).

Figure legends

Figure 1. Gene expression levels in astrocytomas of all malignant grades relative to non-neoplastic samples. Transcript levels of *LOX* (A), *BMP1* (B), and *HIF1A* (C) were determined in 19 non-neoplastic brain tissue samples (NN), 23 pilocytic astrocytomas (AGI), 26 low-grade astrocytomas (AGII), 18 anaplastic astrocytomas (AGIII) and 84 glioblastomas (GBM). Total RNA was reverse-transcribed into cDNA and analyzed by quantitative real-time PCR (RT-qPCR) using the SYBR Green method. Horizontal bars show the median of each group. The differences in expression levels among the groups were statistically significant for *LOX*, *BMP1* and *HIF1A* (Kruskal-Wallis test, $p < 0.0001$). A post-hoc Dunn's test was used to calculate the differences in expression between NN and each astrocytoma group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$). Red lozenges represent *IDH1*-mutated cases in diffusely infiltrative astrocytomas.

Figure 2. Correlation of *LOX*, *HIF1A* and *BMP1* expression levels in astrocytomas of different malignant grades. Correlation was assessed in pilocytic astrocytomas (AGI: A, B and C), low-grade astrocytomas (AGII: D, E and F), anaplastic astrocytomas (AGIII: G, H and I) and glioblastomas (GBM: J, K and L). Statistically significant values were obtained in AGI cases for *BMP1* and *HIF1A* correlation (C) and in GBM cases for *LOX* and *BMP1* correlation (J), *LOX* and *HIF1A* correlation (K) and *HIF1A* and *BMP1* expression levels (L). In AGIII samples, *HIF1A* and *LOX* expression levels were negatively correlated (H). The statistically significant correlations are shown in bold. Correlations between gene expression values were assessed using the non-parametric Spearman-rho correlation test.

Figure 3. Effect of *LOX* knockdown and inhibition in the migratory phenotype of GBM cell lines. *LOX* expression in U87MG and A172 cell lines transfected with *LOX* siRNA relative to that of cells transfected with the non-targeted control (NTC) siRNA was evaluated 2 days after transfection (A). The data show the average of two independent experiments, and the vertical bar represents the standard deviation. Western blots of *LOX* protein were analyzed after transfection with siRNA targeted against *LOX* and non-targeted control (NTC) siRNA (B). Evaluation of the migratory behavior of U87MG (C) and A172 (D) cell lines with no treatment (parental), transfected with NTC siRNA and siRNA specific for *LOX* and treated with the *LOX* inhibitor BAPN. A total of 2.5×10^4

cells were seeded in the upper chamber of Transwell inserts. Cells in the lower chamber were fixed and stained after 18 hours of incubation. Graphs represent the number of migrated cells per field in each condition (means $\pm$ standard errors of the means) in two independent experiments. The pictures show representative fields of cells that crossed the insert in all conditions stained with crystal violet at 40x magnification (Mann-Whitney test, ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$).

Figure 4. Effect of *LOX* knockdown on the invasive phenotype and anchorage-independent growth behavior of GBM cell lines. Evaluation of the invasion (A and B) and anchorage-independent growth (C and D) of U87MG and A172 cell lines after *LOX* silencing with siRNA were compared to the non-targeted control (NTC). A total of 2.5×10^4 cells were seeded in the upper chamber of Transwell inserts. Cells in the lower chamber were fixed and stained with crystal violet after 18 hours of incubation. Graphs represent the number of migrated cells per field in each condition (means $\pm$ standard errors of the means) in the two independent experiments conducted in duplicate. The images show representative fields of U87MG (A) and A172 (B) cells that invaded and crossed the insert (40x magnification). Graphs represent the number of migrated cells per field (means $\pm$ standard errors of the means) of two independent experiments conducted in duplicate. Soft agar colony formation assays were performed for both U87MG (C) and A172 (D) cell lines with 1×10^3 cells. Graphs represent the mean number of colonies $\pm$ SD of two independent experiments conducted in duplicate (Mann-Whitney test, ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$).

Figure 5. *LOX* expression and localization in astrocytomas and non-neoplastic brain tissues. Immunohistochemistry was performed in 6 non-neoplastic brain tissues (NN), 6 pilocytic astrocytoma (AGI), 6 low-grade astrocytoma (AGII), 6 anaplastic astrocytoma (AGIII), and 6 glioblastoma (GBM) cases. The images show representative cases of each type of sample (400x magnification for all cases). Arrows indicate the endothelial cells staining.

Figure 6. LOX immunostaining analysis in astrocytomas and non-neoplastic brain tissues. The graphs illustrate semi-quantitative immunohistochemistry labeling scores (ILS) that refer to the product of staining intensity and the percentage of positive cells stained with anti-LOX in the cytoplasm (A), nucleus (B) and endothelial cells (C). The horizontal bars show the median ILS of each group. The difference in protein expression among the groups was statistically significant for nuclear staining ($p=0.01$) and endothelial cell staining ($p=0.0008$) as determined by a Kruskal-Wallis test.

Table 1. Distribution of *LOX*, *BMP1* and *HIF1A* expression levels in diffusely infiltrative astrocytomas according to *IDH1* mutational status

		<i>IDH1</i>		
	Genes	wild-type	mutated	P*
AGII	<i>LOX</i>	0.148 (0.006 - 0.2854)	0.014 (0.000 - 0.779)	0.049*
	<i>BMP1</i>	2.232 (0.868 - 6.021)	4.602 (1.436- 15.238)	0.850
	<i>HIF1A</i>	0.099 (0.034 - 0.868)	0.158 (0.023 - 0.444)	0.091
	n (%)	5 (19.2)	21 (80.8)	
AGIII	<i>LOX</i>	0.050 (0.027 - 1.776)	0.029 (0.005 - 0.214)	0.285
	<i>BMP1</i>	6.969 (4.710 - 11.458)	13.729 (2.842 - 22.862)	0.791
	<i>HIF1A</i>	0.348 (0.039 - 0.527)	0.244 (0.161 - 0.828)	0.038**
	n (%)	7 (38.9)	11 (61.1)	
GBM	<i>LOX</i>	1.634 (0.012 - 45.777)	0.355 (0.091 - 14.371)	0.008*
	<i>BMP1</i>	7.644 (0.544 - 53.622)	6.989 (2.65 - 49.447)	0.119
	<i>HIF1A</i>	0.369 (0.035 - 2.417)	0.197 (0.076 - 1.852)	0.742
	n (%)	75 (87.2)	11 (12.8)	

Gene expression levels: median (minimum - maximum). *Mann-Whitney test, **t test

References

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, et al. (2007) The WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2: 97-109.
2. Ohgaki H, Kleihues P (2011) Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol* 28: 177–183.
3. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma 19: 764-772.
4. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, et al. (2008) Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 116: 597-602.
5. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Bäcklund LM, Chan R, et al. (2009) IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but are rare in primary glioblastomas. *Neurol Oncol* 11: 341-347.
6. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H (2009) IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 174: 1149-1153.
7. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, et al. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360: 765-773.
8. Gravendeel LA, Kloosterhof NK, Bralten LB, Van Marion R, Dubbink HJ, et al. (2010) Segregation of non-p.R132H mutations in IDH1 in distinct molecular subtypes of glioma. *Hum Mutat* 1: E1186-E1199.
9. Weller M, Wick W, von Deimling A (2011) Isocitrate dehydrogenase mutations: a challenge to traditional views on the genesis and malignant progression of gliomas. *Glia* 59: 1200-1204.
10. Lai A, Kharbanda S, Pope WB (2011) Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol* 29: 4482-4490.
11. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, et al. (2009) IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat* 1: 7-11.
12. Csiszar K (2001) Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70: 1-32.
13. Nishioka T, Eustace A, West C (2012) Lysyl oxidase: from basic science to future cancer treatment. *Cell Struct. Funct* 37: 75-80.

14. Smith-Mungo LI, Kagan HM (1998) Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* 16: 387–398.
15. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, et al. (2006) Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440: 1222–1226.
16. Stewart GD, Gray K, Pennington CJ, Edwards DR, Riddick AC, et al. (2008) Analysis of hypoxia-associated gene expression in prostate cancer: lysyl oxidase and glucose transporter-1 expression correlate with Gleason score. *Oncol Rep* 20: 1561–1567.
17. Schietke R, Warnecke C, Wacker I, Schödel J, Mole DR, et al. (2010) The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *J Biol Chem* 285: 6658–6669.
18. Pez F, Dayan F, Durivault J, Kaniewski B, Aimond G, et al., 2011. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth. *Cancer Res* 71: 1647-1657.
19. Laczko R, Szauter KM, Jansen MK, Hollosi P, Muranyi M, et al. (2007) Active lysyl oxidase (LOX) correlates with focal adhesion kinase (FAK)/paxillin activation and migration in invasive astrocytes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 631-643.
20. Baker AM, Bird D, Welte JC, Gourlaouen M, Lang G, et al. (2013) Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis. *Cancer Res* 73: 583-594.
21. Chesnelong C, Chaumeil MM, Blough MD, Al-Najjar M, Stechishin OD, et al. (2013) Lactate dehydrogenase A silencing in IDH mutant gliomas. *Neuro Oncol* 16: 686-695.
22. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108.
23. Uno M, Oba-Shinjo SM, Silva R, Miura F, Clara CA, et al. (2011) IDH1 mutations in a Brazilian series of Glioblastoma. *Clinics* 66: 163-165.
24. Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, Nieva DR, Sullivan CM, et al. (2002) A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res* 62: 4478-4483.
25. Kagan HM, Trackman PC (1991) Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 206-210.

26. Cox TR, Erler J. (2011) Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* 4: 165-178.
27. Erler JT, Weaver VM (2009) Three-dimensional context regulation of metastasis. *Clin Exp Metastasis* 26: 35-49.
28. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, et al. (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signalling. *Cell* 139: 891-906.
29. Ji F, Wang Y, Qiu L, Li S, Zhu J, et al. (2013) Hypoxia inducible factor 1 α -mediated LOX expression correlates with migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Int J Oncol* 42: 1578-1588.
30. Maruhashi T, Kii I, Saito M, Kudo A (2010) Interaction between periostin and BMP-1 promotes proteolytic activation of lysyl oxidase. *J Biol Chem* 285: 13294-13303.
31. Albinger-Hegy A, Stoeckli SJ, Schmid S, Storz M, Iotzova G, et al. (2010) Lysyl oxidase expression is an independent marker of prognosis and a predictor of lymph node metastasis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC). *Int J Cancer* 126: 2653-2662.
32. Baker AM, Cox TR, Bird D, Lang G, Murray GI, et al. (2011) The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 103: 407-424.
33. Chen LC, Tu SH, Huang CS, Chen CS, Ho CT, et al. (2012) Human breast cancer cell metastasis is attenuated by lysyl oxidase inhibitors through down-regulation of focal adhesion kinase and the paxillin-signaling pathway. *Breast Cancer Res Treat* 134: 989-1004.
34. Sakai M, Kato H, Sano A, Tanaka N, Inose, R, et al. (2009) Expression of lysyl oxidase is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 16: 2494-2501.
35. Ping W, Jiang WY, Chen WS, Sun W, Fu XN (2013) Expression and significance of hypoxia inducible factor-1 α and lysyl oxidase in non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 3613-3618.
36. Basuroy S, Dunagan M, Sheth P, Seth A, Rao RK (2010) Hydrogen peroxide activates focal adhesion kinase and c-Src by a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent mechanism and promotes cell migration in Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G186-195.

37. Sheridan PJ, Kozar LG, Benson SC (1979) Increased lysyl oxidase activity in aortas of hypertensive rats and effect of betaaminopropionitrile. *Exp Mol Pathol* 30: 315-324.
38. Arem AJ, Madden JW, Chvapil M, Tillema L (1975) Effect of lysyl oxidase inhibition of healing wounds. *Surg Forum* 26: 67-69.
39. Lazarus HM, Cruikshank WW, Narasimhan N, Kagan HM (1995) Center DM. Induction of human monocyte motility by lysyl oxidase. *Matrix Biol* 14: 727-731.
40. Abourbih DA, Di Cesare S, Orellana ME, Anteck E, Martins C, et al. (2010) Lysyl oxidase expression and inhibition in uveal melanoma. *Melanoma Res* 20: 97-106.
41. Osawa T, Ohga N, Akiyama K, Hida Y, Kitayama K, et al. (2013) Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer* 109: 2237-2247.
42. Shih YH, Chang KW, Chen MY, Yu CC, Lin DJ, et al. (2013) Lysyl oxidase and enhancement of cell proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 35:250-256.
43. Yang X, Li S, Li W, Chen J, Xiao X, et al. (2013) Inactivation of lysyl oxidase by β -aminopropionitrile inhibits hypoxia-induced invasion and migration of cervical cancer cells. *Oncol Rep* 29: 541-548
44. Bondareva A, Downey CM, Ayres F, et al. (2009) The lysyl oxidase inhibitor, beta aminopropionitrile, diminishes the metastatic colonization potential of circulating breast cancer cells. *PLoS ONE* 4: e5620.
45. Wiel C, Augert A, Vincent DF, Gitenay D, Vindrieux D, et al. (2013) Lysyl oxidase activity regulates oncogenic stress response and tumorigenesis. *Cell Death Dis* 4: e855.
46. Mammoto T, Jiang A, Jiang E, Panigrahy D, Kieran MW, et al. (2013) Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression. *Am J Pathol* 183: 1293-1305.
47. Dong Y, Xie X, Wang Z, Hu C, Zheng Q, et al. (2014) Increasing matrix stiffness upregulates vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma cells mediated by integrin β 1. *Biochem Biophys Res Commun* 444: 427-432.
48. Lee K A, Burgoon LD, Lamb L, Dere E, Zacharewski TR, et al. (2006) Identification and characterization of genes susceptible to transcriptional cross-talk between the hypoxia and dioxin signaling cascades. *Chem Res Toxicol* 19: 1284-49. Mustafa D,

- Swagemakers S, French P, Luider TM, van der Spek P, et al. (2013) Structural and expression differences between the vasculature of pilocytic astrocytomas and glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 7: 1171-1181.
50. Bond JS, Beynon RJ (1995) The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci* 4: 1247-1261.
 51. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, and Greenspan DS (1996) Bone morphogenetic protein-1: The type I procollagen C-proteinase. *Science* 271: 360-362.
 52. Sterchi EE, Stöcker W, Bond JS (2008) Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol Aspects Mol* 29: 309-328.
 53. Ge G, Greenspan DS (2006) Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78: 47–68.
 54. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321: 1807-1812.
 55. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H (2009) IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer* 56. Uno M, Oba-Shinjo SM, de Aguiar PH, Leite CC, Rosemberg S, et al. (2005). Detection of somatic TP53 splice site mutations in diffuse astrocytomas. *Cancer Lett.* 224: 321-327.
 57. Carvalho PO, Uno M, Oba-Shinjo SM, Rosemberg S, Wakamatsu A, et al. (2014) Activation of EGFR signaling from pilocytic astrocytomas to glioblastomas. *Int J* 58. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, et al. (2010) Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17: 510-522.
 59. Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, (2004) Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res* 64: 6410-6415.
 60. Li PA, He Q, Cao T, Yong G, Szauter KM, et al. (2004) Up-regulation and altered distribution of lysyl oxidase in the central nervous system of mutant SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 120: 115-122.
 61. Li W, Nellaiappan K, Strassmaier T, Graham L, Thomas KM, et al. (1997) Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12817-12822.

62. Nellaiappan K, Risitano A, Liu G, Nicklas G, Kagan HM (2000) Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. *J Cell Biochem* 79: 576-582.
63. Saad FA, Torres M, Wang H, Graham L (2010) Intracellular lysyl oxidase: effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells. *Biochem Biophys Res Commun* 39: 944-949.
64. Kagan HM, Li W (2003) Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J. Cell Biochem* 88: 660-672.
65. El-Osta A, Wolffe AP (2000) DNA methylation and histone deacetylation in the control of gene expression: basic biochemistry to human development and disease. *Gene Expr* 9: 63-75.

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

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

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

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

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

Figure 6A-6C
[Click here to download high resolution image](#)