UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

ÚRSULA URIAS DOS SANTOS

**Análise funcional de CD99 na tumorigênese de
astrocitomas**

São Paulo

2014

ÚRSULA URIAS DOS SANTOS

Análise funcional de CD99 na tumorigênese de astrocitomas

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

Programa de Neurologia

Orientador: Profa. Dra. Sueli Mieko Oba Shinjo

Versão corrigida - versão original disponível na Biblioteca FMUSP.

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

Santos, Úrsula Urias dos

Análise funcional de CD99 na tumorigênese de astrocitomas / Úrsula Urias dos Santos. -- 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.Proteína humana CD99 3.Glioblastoma
4.Placenta 5.Migração 6.Neoplasias encefálicas

USP/FM/DBD-396/14

A virtude de não sabermos os finais é que
percorremos os caminhos em sua plenitude.

Aos meus pais, Osvaldo e Claudia, pelo
amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela concretização deste caminho!

À toda minha **família**, pelo amor, confiança e apoio incondicionais. Em especial, ao **Pedro Ottavio** pelos exímios auxílios computacionais!

Ao **Pedro**, pela compreensão e paciência infinitas; pelas palavras de conforto, incentivo e tranquilidade; por toda confiança depositada em mim; por toda sua certeza de finais felizes. Obrigada por tonar minha vida mais leve, doce e positiva!

À **Profa. Dra. Sueli Mieko Oba Shinjo**, pela orientação deste trabalho.

Aos **professores membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

À **Thais, secretária do Programa de Neurologia**, pela atenção e auxílio durante toda a pós-graduação.

Aos **funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina** pelas orientações finais para a formatação da tese.

À **Kika e José Mario**, por todo carinho e preocupação.

Ao **Paulo, Claudia, Mariana, Guilherme, Rosa, Dourival, seu Ivanildo, Dona Izilda, Anderson, Vanessa, Lucas, Denise, Karina, seu Luís, Herik, Mauro e Mario**, por todas as orações diretas e indiretas que fizeram por mim e por tudo aquilo que lhes pedi. Sem vocês, certamente a realização deste trabalho não seria possível. A todos, de coração, meu muito obrigado!

À **Marcele**, minha querida amiga, pelas inúmeras palavras de esperança e amparo. Sua presença em minha vida nesses últimos meses foi fundamental para transpor algumas dificuldades e tornar a vida muito mais alegre e divertida!

A todos os meus **amigos** e a todas as **pessoas** que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao **CNPq, Fapesp, CAPES** pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Aos **pacientes** e seus **familiares**, que mesmo em meio a tanta dor e sofrimento acreditam e confiam na ciência possibilitando desta forma a realização de trabalhos como este.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
SUMMARY	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central	2
1.2. Glioblastoma (GBM)	4
1.3. Vias de sinalização envolvidas na gênese de glioblastoma	7
1.4. Características tumorais atribuídas à placenta	9
1.5. CD99	10
1.6. CD99 associado a progressão tumoral	13
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	20
3.1. Seleção dos genes	21
3.2. Casuística	21
3.3. Linhagens celulares	22
3.4. Cultivo celular	23
3.5. Imunohistoquímica	24
3.6. Imunofluorescência	25
3.7. Extração de RNA total	25
3.8. síntese de cDNA por transcrição reversa	26
3.9. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	26
3.10. Extração protéica	29
3.11. Western blot	29
3.12. Densitometria	30
3.13. Silenciamento do mRNA de <i>CD99</i> mediante a técnica de RNA de interferência	30
3.14. Curva de proliferação	31
3.15. Ensaio de migração	31

3.16. Análise de imunofluorescência em larga escala.....	32
3.17. Análises estatísticas.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Seleção dos genes com elevada expressão em placenta e astrocitomas.....	35
4.2. Análise do perfil de expressão de <i>CD99</i> em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.....	38
4.3. Análise da expressão protéica de <i>CD99</i> em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.....	41
4.4. Imunolocalização de <i>CD99</i> em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.....	42
4.5. Imunolocalização de <i>CD99</i> em linhagens celulares de GBM.....	46
4.6. Efeito da expressão basal de <i>CD99</i> na migração de linhagens celulares de GBM.....	47
4.7. Análise da expressão de <i>CD99</i> nas linhagens celulares U87MG e A172 após silenciamento gênico.....	48
4.8. Efeito do silenciamento de <i>CD99</i> na proliferação das linhagens U87MG e A172.....	49
4.9. Efeito do silenciamento de <i>CD99</i> na migração das linhagens U87MG e A172.....	50
4.10. Análise da localização de <i>CD99</i> na linhagem celular U87MG.....	51
4.11. Silenciamento de <i>CD99</i> acarreta alterações morfológicas na linhagem celular U87MG.....	52
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8. ANEXOS.....	75
8.1. Anexo 1.....	77
8.2. Anexo 2.....	78
8.3. Anexo 3.....	79
8.4. Anexo 4.....	86
8.5. Anexo 5.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ – delta

μg – micrograma

μl – microlitro

μm – micrometro

μM – micromolar

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

A – adenina

AA – aminoácido

AGI – Astrocitoma pilocítico ou grau I

AGII – Astrocitoma difuso ou grau II

AGIII – Astrocitoma anaplásico ou grau III

APS – persulfato de amônia (*amonium persulfate*)

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – adenosina Trifosfato

bp – pares de base

BSA – albumina bovina sérica

C – citosina

CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

Ct – *Threshold Cycle*

C-terminal – carboxil-terminal

Da – Dalton

DAPI – diamidino-2-fenil-indole

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO – dimetil sulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – 2' desoxirribonucleotídeos 5' trifosfato

ECL–reagente quimioluminescente para detecção de Western blot (*Enhanced Chemiluminescence*)

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

Fapesp – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

g – grama

G – guanina

GBM – Glioblastoma

h – hora

HC – Hospital das Clínicas

H&E – Hematoxilina-eosina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

kb – quilo base

kDa – quilo Dalton

l – litro

LIM15 – Laboratório de Investigação Médica 15

LOH – perda de heterozigose

M – molar

MAb – anticorpos monoclonais agonistas

mg – miligrama

ml – mililitro

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

ng – nanograma

nm – nanômetro

NP-40 – detergente não iônico

N-terminal – Amino-terminal

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – braço curto de um cromossomo

p – Probabilidade

P – fosforilação

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PAR – região pseudo-autossômica

pb – pares de base

PBS – solução tampão fosfato salina

PCR – reação em cadeia pela polimerase

Pg – picograma

pH – potencial hidrogeniônico

q – braço longo de um cromossomo

qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real

r – Coeficiente de correlação

RIPA – tampão para extração de proteínas (*Radioimmunoprecipitation assay*)

RNA – ácido ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

r.p.m. – rotações por minuto

RT-PCR – transcriptase reversa – reação em cadeia pela polimerase

SDS – dodecil sulfato de sódio

SFB – soro fetal bovino

siRNA – pequeno RNA de interferência

SNC – Sistema Nervoso Central

T – timina

TBS – solução tampão salina Tris

TBS-T – solução tampão salina Tris com Tween 20

TE – Tris-EDTA

TBE – Tris Borato EDTA

TEMED – N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamino, N,N,N',N' – Di-(dimetilamino) etano
(*N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'-Di-(dimethylamino) ethane*)

Tris – Tris (hidroximetil) amino metano

U – unidade

U – uracila

V – volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações genéticas envolvidas na gênese de glioblastoma primário <i>versus</i> secundário.....	6
Figura 2. Vias de sinalização freqüentemente alteradas em glioblastoma.....	8
Figura 3. Representação estrutural do mRNA das isoformas do gene CD99.....	11
Figura 4. Esquema mostrando a estratégia empregada para a seleção de genes específicos com expressão aumentada em placenta e astrocitomas.....	37
Figura 5. Perfil de expressão de CD99 em astrocitomas e tecido cerebral não neoplásico.....	39
Figura 6. Correlação do perfil de expressão de <i>CD99</i> com a localização da lesão em GBMs.....	40
Figura 7. Perfil de expressão protéica de CD99 em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecido cerebral não neoplásico.....	41
Figura 8. Fotomicroscopias óticas representativas de imunoistoquímica para CD99 em astrocitomas e tecido cerebral não neoplásico.....	43
Figura 9. Análise semi-quantitativa da imunolocalização de CD99.....	45
Figura 10. Fotomicroscopias óticas representativa de imunoistoquímica para CD99 em linhagens celulares de glioblastoma.....	46
Figura 11. Efeito da expressão de CD99 na capacidade migratória de linhagens celulares de GBM.....	47
Figura 12. Expressão relativa de <i>CD99</i> nas linhagens celulares A172 e U87MG em diferentes dias após silenciamento com siRNA.....	48
Figura 13. Expressão de CD99 nas linhagens celulares U87MG e A172 após silenciamento com siRNA.....	49
Figura 14. Efeito do silenciamento de CD99 na proliferação das linhagens celulares U87MG e A172.....	50
Figura 15. Avaliação do comportamento migratório das linhagens celulares U87MG e A172 após o silenciamento de <i>CD99</i>	51
Figura 16. Análise da expressão e localização da proteína CD99 em células U87MG...	52
Figura 17. Análise da morfologia celular após silenciamento de <i>CD99</i> na linhagem U87MG.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos subtipos histológicos de astrocitomas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerando a malignidade (grau), invasibilidade e característica histológica.....	4
Tabela 2. Descrição da alteração da expressão de CD99 em diversos tipos de câncer.....	14
Tabela 3. Tamanho do produto e sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para as reações de PCR quantitativo em tempo real.....	28
Tabela 4. Análise da expressão dos genes com aumento de expressão em placenta e astrocitomas em 10 amostras de tecido tumoral não neoplásico e 20 glioblastomas (GBMs).....	38

RESUMO

Santos, U.U. Análise funcional de CD99 na tumorigênese de astrocitomas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Astrocitomas constituem o tipo mais comum de tumor cerebral neuroepitelial primário apresentando grande heterogeneidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os astrocitomas podem ser histologicamente divididos em graus I- IV. Astrocitomas pilocíticos (grau I) são tumores circunscritos, de crescimento lento e bom prognóstico. Astrocitomas difusos (grau II) apresentam hipercelularidade, crescimento relativamente lento e propensão para invadir o tecido cerebral normal adjacente. Astrocitomas anaplásicos (grau III) apresentam aumento da celularidade, atipia nuclear e figuras mitóticas. Glioblastomas (GBMs – grau IV) representam o mais frequente e maligno tumor cerebral humano com crescimento extremamente agressivo, anaplasia, células altamente proliferativas, com frequente neoangiogênese e necrose. O comportamento altamente invasivo dos GBMs, caracterizado pela infiltração difusa para o parênquima cerebral normal adjacente, inviabiliza a remoção cirúrgica total do tumor. Além disso, as células dos GBMs são relativamente resistentes às terapias disponíveis. Analogamente a outros tipos de câncer, os GBMs demonstram comportamentos semelhantes às de células trofoblásticas, sugerindo vias de sinalização compartilhadas no controle dos processos tumorigênicos e de implantação da placenta. Em ambos os casos, o estabelecimento de um fenótipo invasivo compreende processos celulares que incluem aumento da proliferação, expressão ou repressão de moléculas de adesão celular específicas, produção de enzimas que digerem a matriz extracelular, expressão de produtos de proto-oncogenes, ativação da telomerase, evasão ou edição da resposta imune do hospedeiro e angiogênese. Com base nas características comuns entre células tumorais e trofoblastos, o presente trabalho teve como objetivo a busca *in silico* de genes expressos em placenta e tecidos tumorais e que podem contribuir para o estabelecimento e manutenção do fenótipo maligno, utilizando os bancos de dados de MPSS e SAGE. Dentre os 12 genes avaliados, *CD99* foi o que apresentou o maior valor de expressão média nas amostras de GBM em comparação a amostras de tecido cerebral não neoplásico. Em uma casuística ampliada de astrocitomas, observou-se uma maior expressão relativa de *CD99* em todos os graus de malignidade, sendo que os GBMs apresentaram os valores mais elevados. Esses achados foram confirmados em nível proteico por western blot e imunoistoquímica. Além disso, foi realizada a análise de imunolocalização de *CD99* em amostras de tumores astrocíticos, com localização restrita a membrana ou citoplasma, em contraste ao tecido cerebral não neoplásico ou astrocitomas pilocíticos não infiltrantes, que não apresentaram marcação nestas estruturas. Ao compararmos três linhagens celulares derivadas de GBM, *CD99* apresentou maior expressão na membrana e maior capacidade migratória nas linhagens A172 e U87MG, enquanto que a linhagem T98G apresentou menor expressão da proteína e ausência de capacidade migratória. O silenciamento da expressão de *CD99* por siRNA diminuiu significativamente a migração das linhagens celulares A172 e U87MG. Além disto, anticorpo anti-*CD99* apresentou maior marcação por em lamelipódios das células U87MG, possivelmente por reorganização do citoesqueleto de actina. Os resultados integrados de expressão gênica e proteica sugerem que a expressão de *CD99* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade pode contribuir para a capacidade infiltrativa destes tumores, ressaltando a importância desta proteína como um potencial alvo para a redução da capacidade infiltrativa dos astrocitomas nos processos de migração e invasão.

Descritores: 1.Astrocitoma 2.Proteína humana CD99 3.Glioblastoma 4.Placenta 5.Migração 6.Neoplasias encefálicas

SUMMARY

Santos, U.U. Functional analysis of CD99 in astrocytomas tumorigenesis [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Astrocytomas are the most common type of primary neuroepithelial brain tumour and show great heterogeneity. According to World Health Organization criteria, astrocytomas can be histologically separated into grades I through IV. Pilocytic astrocytomas (grade I) are circumscribed, slow growing tumours with a good prognosis and mainly occur in children or young adults. Low-grade astrocytomas (grade II) show hypercellularity, relatively slow growth, and a propensity to invade surrounding normal brain tissue. Anaplastic astrocytomas (grade III) have increased cellularity, nuclear atypia, and mitotic figures. Glioblastomas (GBMs - grade IV), are the most common malignant and aggressive of all brain malignancies, exhibiting anaplastic, highly proliferative cells, with frequent neoangiogenesis and necrosis. GBM cells can escape complete resectability and are relatively resistant to the available therapies (radiation and chemotherapy). Similar to other cancer types, GBMs demonstrates behaviours that are analogous to trophoblastic cells, suggesting shared pathways to control tumourigenic processes and placental implantation. In both cases, the establishment of an invasive phenotype comprises cellular processes that include increased proliferation, the expression or repression of specific cell adhesion molecules, the production of enzymes that digest the extracellular matrix, the expression of proto-oncogene products, telomerase activation, evasion or edition of the host immune response, and angiogenesis. Based on the shared characteristics of tumour cells and trophoblasts, we searched *in silico* for genes that are in both placenta and tumour tissues using MPSS and SAGE databases and that could contribute to the establishment and maintenance of a malignant phenotype. Among 12 selected genes, CD99 exhibited the highest relative mRNA expression in GBM compared to non-neoplastic brain tissues. In a larger cohort of astrocytic tumours, we further demonstrated increased CD99 expression in all malignant grades, with GBMs showing the highest values. These findings were confirmed at the protein level by Western blotting and immunohistochemistry. Additionally, we demonstrated the CD99 localisation profile in astrocytic tumours. Interestingly, CD99 expression was confined to the cytoplasm or membrane in more malignant astrocytomas, in contrast to non-neoplastic brain tissue or non-infiltrative pilocytic astrocytoma, which showed no obvious staining in these structures. Comparison of three GBM cell lines revealed higher CD99 expression at the membrane and higher migratory capacity in the A172 and U87MG lines, but lower CD99 expression and no migratory ability in the T98 line. Knocking down CD99 expression by siRNA decreased significantly the migration of both A172 and U87MG cell lines. Additionally, a higher anti-CD99 antibody staining was observed in lamellipodia of U87MG, probably because of actin cytoskeletal reorganization. These integrated CD99 gene and protein expression results suggest that CD99 expression in astrocytomas of different malignant grades might contribute to the infiltrative ability and support the importance of CD99 as a potential target to reduce infiltrative astrocytoma capacity in migration and invasion.

Descriptors: 1.Astrocytomas 2. CD99 human protein 3.Glioblastoma 4.Placenta 5.Migration 6.Brain neoplasm

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central

As neoplasias do sistema nervoso central (SNC), que correspondem aos tumores de cérebro e medula espinhal, constituem um grupo heterogêneo com relação à epidemiologia, apresentação clínica, diagnóstico anatomopatológico, tratamento e prognóstico (Louis *et al.*, 2007a; Adamson *et al.*, 2010; Ostrom *et al.*, 2014). Embora não muito frequente, representando na população mundial 1,9% de todas as neoplasias malignas, esse tipo de câncer contribui significativamente para a morbidade global, uma vez que são essencialmente incuráveis (Huttner, 2012).

Durante as últimas décadas, a incidência e a mortalidade dos tumores do SNC aumentaram na maioria dos países desenvolvidos, principalmente nas faixas etárias mais avançadas. Atribui-se parte desse aumento à melhoria e à introdução de novas tecnologias diagnósticas menos invasivas, como, por exemplo, tomografia computadorizada, ressonância magnética e a tomografia por emissão de pósitrons (PET Scan). Em publicação bianual do Instituto Nacional de Câncer (INCA), do Ministério da Saúde, o número de casos novos de câncer do SNC esperado para o Brasil em 2014 é de 4.960 casos novos em homens e 4.130 em mulheres, com risco estimado de 5,07 casos novos a cada 100 mil homens e 4,05 a cada 100 mil mulheres (<http://www.inca.gov.br>). A distribuição etária deste tipo tumoral é peculiar, com alta incidência em crianças até os 10 anos de idade, e adultos na terceira e quarta décadas de vida, representando o tumor sólido mais frequente da infância e o sexto tipo de câncer mais comum em adultos, com ocorrência sutilmente maior no sexo masculino (Fleming & Chi, 2012). Fatores de risco bem estabelecidos incluem síndromes genéticas familiares raras como neurofibromatose tipo 1 (NF-1) e 2 (NF-2), síndromes de von Hippel-Lindau, Li-Fraumenie e Turcot, além da exposição à radiação ionizante (Ricard *et al.*, 2012). Entretanto, a etiologia específica e os agentes ou eventos responsáveis pelo surgimento e progressão dos tumores cerebrais permanecem indeterminados, uma vez que mais de 90% das ocorrências de gliomas não está relacionada a nenhuma destas síndromes genéticas. Desta maneira, sugere-se que anormalidades genéticas complexas combinadas a fatores

ambientais até o momento desconhecidos contribuem para a predisposição individual aos tumores do SNC (Darefsky *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2012).

A classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) estratifica os tumores do SNC em grupos derivados do tecido neuroepitelial, dos nervos periféricos, das meninges, de células germinativas, da região selar, tumores metastáticos, linfomas e neoplasias hematopoiéticas. Nesta classificação são reconhecidos oficialmente mais de 120 formas de tumores do SNC (Louis *et al.*, 2007a; Louis *et al.*, 2007b).

Os tumores originários das células da glia, genericamente conhecidos como gliomas, são os tumores neuroepiteliais primários mais comuns do SNC, representando mais de 30% de todos os tumores malignos cerebrais primários e do SNC. De acordo com características morfológicas e clínicas incluem-se nesse grupo os astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas mistos e ependimomas (Persano *et al.*, 2013). Dentre os gliomas, os tumores derivados de astrócitos ou astrocitomas constituem o principal tipo histológico entre os tumores neuroepiteliais primários do SNC, abrangendo aproximadamente 70% do total (Chen *et al.*, 2012; Brower *et al.*, 2014).

Os astrocitomas são um grupo de neoplasias intracranianas heterogêneo com citoplasma abundante e marcação positiva para a proteína GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Estes tumores são divididos histologicamente em quatro subtipos com base na quantidade das seguintes características histológicas de anaplasia: atividade mitótica, atipia nuclear, necrose e proliferação microvascular (Kleihues *et al.*, 2002; Miller & Perry, 2007). A classificação proposta pela OMS é utilizada como padrão de classificação internacional e subdivide os astrocitomas em níveis crescentes de malignidade que são: pilocítico (grau I), difuso (grau II), anaplásico (grau III) e glioblastoma (grau IV) (GBM). Os astrocitomas de grau II a IV são designados difusamente infiltrativos devido à característica de invadir o tecido cerebral normal (Tabela 1) (Reifenberger & Collins, 2004; Ohgaki & Kleihues, 2007; Ohgaki & Kleihues, 2011).

Tabela 1: Classificação dos subtipos histológicos de astrocitomas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerando a malignidade (grau), invasibilidade e característica histológica.

	Grau	Denominação	Características Histológicas
Não Infiltrativos	I	Astrocitoma pilocítico	Ausência de anaplasia
	II	Astocitoma difuso	1 critério de anaplasia: atipia nuclear
Difusamente Infiltrativos	III	Astrocitoma anaplásico	2 critérios de anaplasia: atipia nuclear e atividade mitótica
	IV	Glioblastoma (GBM)	3 ou 4 critérios de anaplasia: atipia nuclear, atividade mitótica, proliferação endotelial e/ou necrose

1.2. Glioblastoma (GBM)

O GBM é o tumor cerebral humano mais frequente e maligno, com crescimento extremamente agressivo. As células tumorais dos GBMs ajustam sua forma e volume rapidamente ao invadirem o parênquima cerebral apresentando um modelo de distribuição tecidual difuso, inviabilizando, assim, a remoção cirúrgica total.

GBMs afetam todas as idades, com um pico de incidência entre os 50 e 60 anos de idade e uma ligeira predominância do sexo masculino (Brower *et al.*, 2014). As manifestações clínicas são decorrentes da progressiva disfunção neurológica que varia de acordo com a área do cérebro acometida, sendo, em geral, tumores refratários aos principais métodos de tratamento devido à grande plasticidade das células tumorais. Em virtude de seu alto potencial proliferativo, da destruição de extensas áreas de tecido nervoso devido ao seu

caráter infiltrativo e do intenso edema gerado, o prognóstico dos pacientes é bastante reservado. A sobrevida média global após ressecção cirúrgica, ainda que combinada com terapias adjuvantes com radioterapia e quimioterapia com temozolamida, é de aproximadamente 14,6 meses (Westermarck, 2012).

De acordo com sua origem e evolução, os GBMs podem ser classificados em primário ou secundário. Mais de 90% dos casos são diagnosticados sem uma evidência clínica ou de lesão histopatológica maligna anterior, correspondendo assim ao subtipo primário (Ohgaki & Kleihues, 2009). Já os GBMs com desenvolvimento neoplásico a partir de um astrocitoma de menor grau (II ou III) são definidos como secundário (Figura 1). Embora não haja diferenças do ponto de vista histopatológico, tais subtipos representam entidades distintas, pois afetam indivíduos em diferentes faixas etárias, através de alterações genéticas e vias de sinalizações distintas com características moleculares e curso clínico variável (Ohgaki & Kleihues, 2011; Wilson *et al.*, 2014). Os GBMs estão entre os tumores humanos mais vascularizados, uma vez que a progressão da malignidade deste tipo tumoral é acompanhada de intensa proliferação vascular (Phillips *et al.*, 2006). Além da heterogeneidade morfológica, os GBMs são também tumores bastante heterogêneos em termos moleculares; os trabalhos que analisaram o DNA destes tumores revelaram a presença de diversas mutações comuns em genes que codificam proteínas que controlam a progressão do ciclo celular e transdução de sinal (Verhaak *et al.*, 2010). Diversos estudos demonstraram que quanto maior o grau de malignidade de um tumor, maior o número de anormalidades genéticas adquiridas.

Figura 1. Alterações genéticas envolvidas na gênese de glioblastomas primário versus secundário. Ambos GBMs primários e secundários surgem a partir de células precursoras que podem ser distintas. GBMs primários surgem *de novo* e apresentam disfunção da via de sinalização p53 e Rb assim como desregulação da via de sinalização RTK/RAS/PI3K, em pacientes mais velhos e com pior prognóstico e genótipo predominante *IDH1* tipo selvagem (WT) ou não mutado. Em contraste, glioblastomas secundários são precedidos por lesões de menor grau, que progridem passando por lesões grau III ou diretamente para um GBM. Estes tumores ocorrem em indivíduos mais jovens, com localização mais restrita ao lobo frontal, predominância de genótipo *IDH1* mutante, o que confere um melhor prognóstico aos pacientes. *RTK*: receptor tirosina cinase; *NF1*: neurofibromatose Tipo-1; *NFK1B*: fator nuclear do gene enhancer do polipeptídeo leve Kappa nas células-B 1; *PIK3R1/PIK3CA*: fosfatidilinositol 3-cinase subunidade regulatória alfa 1/fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-

cinase subunidade catalítica alfa; *PTEN*: homólogo à fosfatase e tensina; *TP53*: proteína tumoral; *CDK2N2A*: inibidor da cinase dependente de ciclina 2A; *CDKN2B*: inibidor da cinase dependente de ciclina 2B; *RBI*: retinoblastoma 1; *CDK4*: cinase dependente de ciclina 4; *IDH1*: isocitrato desidrogenase 1; *CDKN2A*: inibidor da cinase dependente de ciclina 2A; *CDK6*: cinase dependente de ciclina 6; *EGFR*: receptor do fator de crescimento epidermal; *PDGFRA*: receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas A. Adaptado de Dunn *et al.*, 2012.

1.3. Vias de sinalização envolvidas na gênese de glioblastomas

Durante a transformação neoplásica alguns mecanismos genéticos estão envolvidos na inativação de genes supressores tumorais, por eliminação física ou mutações inativantes, e na ativação de oncogenes celulares, por aumento da quantidade de genes (amplificação) ou mutações ativantes. As alterações genéticas promovidas por estes genes refletem em alterações na atividade de diversas vias de transdução de sinal relacionadas à proliferação celular que nos GBMs, assim como em outros tipos de câncer, estão significativamente elevadas em relação ao cérebro normal e gliomas de baixo grau. Uma alteração comum à grande maioria dos GBMs é a elevada produção de fatores de crescimento tais como FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) e seus respectivos receptores FGFR-2, CNTFR α e PDGFR (Ozog *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2012; Nakada *et al.*, 2013). Tais moléculas são capazes de mediar uma sinalização autócrina induzindo, ao menos em parte, as altas taxas proliferativas observadas neste tipo tumoral. As atividades de Ras e Akt também se encontram alteradas, muitas vezes elevadas na maioria dos GBMs analisados (Fernández-Medarde & Santos, 2011; Höland *et al.*, 2011; McDowell *et al.*, 2011). O nível de expressão de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), um supressor tumoral antagonista da via PI3K/Akt, está relacionado com a malignidade dos GBMs já que quanto maior a expressão desta proteína, melhor o prognóstico dos pacientes (Lino & Merlo, 2011; De Luca *et al.*, 2012). A redução ou perda de *PTEN* apresenta-se como um evento comum durante a progressão dos gliomas de baixo grau a GBMs (Chappell *et al.*, 2011; Camara-Quintana *et al.*, 2012) (Figura 2). Devido à grande heterogeneidade molecular e clínica dos GBMs há um interesse crescente em se determinar as bases biológicas da progressão maligna neste tipo tumoral.

Figura 2. Vias de sinalização frequentemente alteradas em glioblastomas. Alterações genéticas frequentes nos componentes das vias de sinalização RTK/RAS/PI3K (a), p53 (b) e RB (c). Símbolos em vermelho indicam alterações genéticas ativadoras e os genes alterados com maior frequência estão apresentados em tons mais escuros de vermelho. Símbolos em azul indicam alterações genéticas inativadoras e tons mais escuros de azul correspondem a maiores porcentagens de alteração. A natureza da alteração e a porcentagem dos tumores afetados estão indicadas para cada componente alterado de uma via representada. Os quadros apresentam a porcentagem final de GBMs com alteração em pelo menos um gene conhecido na via designada. Adaptado de Cancer Genome Atlas Research Network, 2008.

1.4. Características tumorais atribuídas à placenta

A gestação hemocorial humana é um modo de reprodução extremamente complexo já que impõe ao organismo materno um desafio biológico por requerer tolerância imunológica materna em relação ao feto em desenvolvimento, além de fornecer o aporte energético necessário ao seu desenvolvimento. Estrutura chave para o sucesso reprodutivo em mamíferos, a placenta, é um órgão transitório que garante este suporte de nutrientes, oxigênio e hormônios para o desenvolvimento fetal. Além disso, a placenta desempenha papel fundamental na modulação da resposta imune materna já que ativamente segrega substâncias sinalizadoras e fatores imunoregulatórios que garantem a manutenção do concepto no útero. Para o estabelecimento deste suprimento contínuo de nutrientes e moléculas sinalizadoras faz-se necessário um acesso eficiente do sangue materno para a superfície de transporte fetal. Assim, células trofoblásticas da placenta humana proliferam, migram e invadem tanto o útero gravídico quanto sua vascularização com a finalidade de nutrir o feto em desenvolvimento, de maneira muito semelhante ao que ocorre durante a progressão de diversos tumores malignos (Ferretti *et al.*, 2007; Soundararajan *et al.*, 2004).

Apesar de a placenta ser um tecido normal, suas células constituintes, os trofoblastos, compartilham várias características com as células tumorais de modo que diversas semelhanças podem ser notadas entre a implantação do embrião no útero e o crescimento de células cancerosas (Ferretti *et al.*, 2007; Soundararajan *et al.*, 2004). O estabelecimento de um fenótipo invasivo, em ambos os casos, compreende processos celulares que incluem:

- a expressão ou repressão de moléculas de adesão;
- a produção de enzimas que digerem a matriz extracelular;
- a expressão de protooncogenes;
- a ativação de telomerase e a aquisição de um rico suprimento sanguíneo;
- a capacidade de iludir o sistema imune.

Desta maneira, a comparação entre a placenta e os tumores malignos é de grande importância para o entendimento dos elementos de invasão e migração que são utilizados eficientemente pelas células tumorais durante o processo tumorigênico. Os componentes

mais importantes para a migração e invasão da célula tumoral são as moléculas da matriz extracelular, como fibronectina, laminina, colágeno, seus receptores, como integrinas, e enzimas que degradam a matriz (metaloproteinases). Entretanto, poucos estudos focaram o melhor conhecimento dos elementos comuns utilizados pela placenta e tumores durante o processo invasivo. Algumas vias comuns para GBMs e trofoblastos já foram descritas, tais como o aumento da expressão do fator de crescimento epidérmico e o seu receptor e fator de crescimento endotelial vascular e o seu receptor (Nomura *et al.*, 1998; Ferreti *et al.*, 2007; Holtan *et al.*, 2009).

Assim, com base nas características compartilhadas entre células tumorais e trofoblastos e com o intuito de descobrir novos alvos terapêuticos, nosso grupo de pesquisa selecionou *in silico* genes hiperexpressos em glioblastomas (GBMs) em relação ao astrocitoma pilocítico (AGI) pela análise de *microarray* de oligonucleotídeos (Marie *et al.*, 2008). E, em outro estudo do grupo, procuraram-se genes com aumento de expressão em placenta e tumores (Projeto Fapesp 06/56989 - “Estudo da expressão aberrante em tumores do sistema nervoso central de genes envolvidos em placenta”). Entre os genes selecionados nos dois estudos, o que codifica uma glicoproteína denominada *CD99* mostrou-se com maior expressão em GBMs em relação ao astrocitoma pilocítico em uma série ampliada de astrocitomas.

1.5. CD99

CD99 é uma glicoproteína transmembrana de 32 kDa altamente glicosilada, identificada pela primeira vez com o anticorpo monoclonal 12E7 (Levy *et al.*, 1979) e semelhante a outras glicoproteínas do tipo sialomucinas, tais como CD34 e CD43, as quais representam típicas moléculas de superfície transdutoras de sinais (Gelin *et al.*, 1989; Rosenkranz *et al.*, 1993; Madjic *et al.*, 1994).

A proteína CD99 é codificada pelo gene *CD99*, também denominado *MIC2*, o qual está localizado na região pseudo-autossômica (PAR) dos cromossomos sexuais X (Xp22.32) e Y (Yp11.3), necessária para o emparelhamento correto dos cromossomos morfologicamente diferentes durante a meiose masculina (Petit *et al.*, 1988). *CD99* é

composto por 10 exons compreendendo aproximadamente 52 kb de tamanho (Smith *et al.*, 1993) e não pertence a qualquer família de genes conhecida (Aubrit *et al.*, 1989). Estudos sobre o mecanismo de regulação da transcrição de *CD99* demonstraram que o gene codifica duas isoformas distintas da proteína CD99 produzidas por *splicing* alternativo de seu transcrito primário: variante selvagem longa (isoforma I – *CD99_{wt}*) de 32 kDa e variante curta (isoforma II – *CD99_{sh}*) de 28 kDa (Hahn *et al.*, 1997; Scotlandi *et al.*, 2007). A proteína CD99 selvagem (isoforma I) é composta por um domínio extracelular (extremidade N-terminal) de 100 aminoácidos que, via modificação pós-traducional, é *O*-glicosilado, seguido de um domínio transmembranar hidrofóbico de 25 aminoácidos e, finalmente, um domínio intracitoplasmático (extremidade C-terminal) hidrofílico composto por 38 aminoácidos (Goodfellow *et al.*, 1988; Gelin *et al.*, 1989). A isoforma II, resultante de *splicing* alternativo, é idêntica à isoforma I exceto pelo domínio intracitoplasmático, pois apresenta uma deleção e, desta forma, um tamanho menor do que aquele encontrado na outra isoforma. Em particular, o transcrito referente à isoforma II apresenta uma inserção de 18 pares de bases no limite entre os exons 8 e 9 do gene *CD99*, o qual introduz um códon de parada gerando assim um polipeptídeo menor, mostrado na Figura 3 (Hahn *et al.*, 1997).

Figura 3. Representação estrutural do mRNA das isoformas do gene *CD99*. O transcrito referente à isoforma II apresenta uma inserção de 18 pares de base no limite entre os exons 8 e 9 do gene *CD99*.

Inúmeros estudos, principalmente no tecido hematopoiético, realizados com anticorpos monoclonais agonistas (MAb) anti-CD99 demonstraram que a ação de CD99 depende do grau de diferenciação celular e auxiliaram no entendimento das funções

fisiológicas exercidas por esta proteína que apresenta suas isoformas diferencialmente expressas de maneira tecido específico. Células T periféricas apresentam expressão exclusiva da isoforma I enquanto que timócitos duplo positivos expressam ambas isoformas (Lee *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Além disso, a expressão celular diferencial das isoformas de CD99 acarreta em destinos funcionais distintos. Em células Jurkat CD99-deficientes a expressão da isoforma I é suficiente para promover adesão celular, enquanto que a coexpressão de ambas isoformas desencadeia a morte celular (Alberti *et al.*, 2002). Em células B a isoforma II inibe a adesão homotípica e a ativação da isoforma I promove a adesão célula-célula, indicando que o gene *CD99* produz duas proteínas distintas com funções opostas, ao menos na fisiologia do sistema imune (Hahn *et al.*, 1997; Bernard *et al.*, 2000). Os efeitos opostos destas isoformas em células B são decorrentes do controle diferencial que exercem na expressão da molécula de adesão celular integrina LFA-1 (Schenkel *et al.*, 2002). De maneira genérica, a expressão de CD99 tem sido relacionada a diversos processos biológicos. No sistema imune CD99 participa na diapedese, diferenciação de células T e timócitos, migração e morte celular apoptótica caspase-independente em linfócitos T, adesão entre linfócitos e células endoteliais (Lou *et al.*, 2007; Bixel *et al.*, 2010; Moricoli *et al.*, 2014).

Diversos trabalhos demonstraram que a ativação de CD99 é capaz de aumentar a expressão de inúmeras moléculas de adesão presentes nas superfícies celulares tais como fosfatidilserina (PS), TCR, MHC classe I e II, LFA-1 (integrina $\alpha_1\beta_2$), PCAM-1, ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1, além de induzir a concentração destas moléculas nos locais de contato célula-célula (Hahn *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 1998; Bernard *et al.*, 2000; Kasinrerk *et al.*, 2000; Schenkel *et al.*, 2002; Yun *et al.*, 2006; Lou *et al.*, 2007; Khunkaewla *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2009; Pata *et al.*, 2011; Torzicky *et al.*, 2012.) Estudos *in vitro* visando a compreensão do papel biológico exercido por CD99, assim como as vias de sinalização mediadas por esta proteína, identificaram que a estimulação de CD99 está diretamente relacionada a repolimerização da actina com recrutamento de moléculas como GTPases Rho, Rac que apresentam papel crucial na regulação do rearranjo de microtúbulos e, portanto, exercendo papel fundamental na remodelação do citoesqueleto celular (Alberti *et al.*, 2002; Brunton *et al.*, 2004; Cerisano *et al.*, 2004). Além disso, demonstrou-se que após

propagação de estímulos a proteína CD99 localiza-se nos *rafts* lipídicos de membrana e que tal alocação é necessária para que CD99 desempenhe suas funções, semelhante ao que ocorre com CD47 (Alberti *et al.*, 2002).

1.6. CD99 associado à progressão tumoral

Por atuar em vias de sinalização que controlam funções celulares como adesão e diferenciação celular, proliferação, migração celular e arquitetura tecidual e assim modular as interações entre células tumorais e microambiente, não é surpreendente que a expressão de CD99 esteja alterada em diversos tipos de câncer (Tabela 2). Além de seu papel fisiológico, a expressão de CD99 tem sido associada a inúmeras neoplasias incluindo angiofibroma (He *et al.*, 2014), angiomiofibroblastoma (Magro *et al.*, 2014), câncer gástrico (Lee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014), câncer de mama (Milanezi *et al.*, 2001; Byun *et al.*, 2006), câncer de pâncreas (Laje *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014), câncer de próstata e testículo (Kommoss *et al.*, 2000; Scotlandi *et al.*, 2007), câncer de pulmão (Yoo *et al.*, 2005; Edlund *et al.*, 2012), carcinoma de vesícula biliar (Choi *et al.*, 2004), condrossarcoma mesenquimal (Brown & Boyle, 2003), ependimomas (Mahfouz *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014), gliomas (Seol *et al.*, 2012), hemangioma (Luca *et al.*, 2014), hemangiopericitoma (Michi *et al.*, 2013), hepatoblastoma (Ramsay *et al.*, 2008), leucemia linfoblástica e linfomas (Ambros *et al.*, 1991; Dworzak *et al.*, 1999; Buxton *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012; Terada, 2012; Liu *et al.*, 2013), melanoma (Wilkerson *et al.*, 2006), osteosarcoma (Manara *et al.*, 2006; Scotlandi *et al.*, 2007; Sciandra *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014;), rabdomiosarcomas (Ramani *et al.*, 1993; Folpe *et al.*, 2002), sarcoma sinovial (Hartel *et al.*, 2007), tumores endócrinos pancreáticos (Maitra *et al.*, 2003; Goto *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2006), tumores neuroendócrinos cutâneos (Terada *et al.*, 2013); tumores fibrosos solitários (Conzo *et al.*, 2014), tumores ovarianos (Choi *et al.*, 2000) entre outros. Porém, o sarcoma de Ewing, sem exceção, é o tumor que expressa a proteína CD99 de maneira mais consistente, característica esta que permite a utilização de CD99 como um marcador diagnóstico deste tipo neoplásico (Ambros *et al.*, 1991; Rocchi *et al.*, 2010; Ramon *et al.*, 2013; O'Neill *et al.*, 2014).

Tabela 2. Descrição da alteração da expressão de CD99 em diversos tipos de câncer.

Tipo de Tumor	Expressão de CD99	Referência
Angiofibroma	↑expressão	He <i>et al.</i> , 2014
Angiomiofibroblastoma	↑expressão	Magro <i>et al.</i> , 2014
Condrossarcoma mesenquimal	↑expressão	Brown & Boyle, 2003
Ependimoma	↑expressão	Mahfouz <i>et al.</i> , 2008; Liu <i>et al.</i> , 2014
Gástrico	↓expressão	Lee <i>et al.</i> , 2007; Chen <i>et al.</i> , 2014
Glioma	↑expressão	Seol <i>et al.</i> , 2012
Hemangioma	↑expressão	Luca <i>et al.</i> , 2014
Hemangiopericitoma	↑expressão	Michi <i>et al.</i> , 2013
Hepatoblastoma	↑expressão	Ramsay <i>et al.</i> , 2008
Leucemia linfoblástica e linfoma	↑expressão	Ambros <i>et al.</i> , 1991; Dworzak <i>et al.</i> , 1999; Buxton <i>et al.</i> , 2009; Huang <i>et al.</i> , 2012; Terada, 2012; Liu <i>et al.</i> , 2013
Mama	↑expressão	Milanezi <i>et al.</i> , 2001; Byun <i>et al.</i> , 2006
Melanoma	↑expressão	Wilkerson <i>et al.</i> , 2006
Osteossarcoma	↓expressão	Manara <i>et al.</i> , 2006; Scotlandi <i>et al.</i> , 2007; Sciandra <i>et al.</i> , 2014; Zhou <i>et al.</i> , 2014
Ovário	↑expressão	Choi <i>et al.</i> , 2000
Pâncreas	↑expressão	Laje <i>et al.</i> , 2013; Park <i>et al.</i> , 2014
Próstata e Testículo	↓expressão	Kommoss <i>et al.</i> , 2000; ; Scotlandi <i>et al.</i> , 2007
Pulmão	↑expressão	Yoo <i>et al.</i> , 2005; Edlund <i>et al.</i> , 2012
Rabdomiosarcoma	↓expressão	Ramani <i>et al.</i> , 1993; Folpe <i>et al.</i> , 2002
Sarcoma de Ewing	↑expressão	Ambros <i>et al.</i> , 1991; Rocchi <i>et al.</i> , 2010; Ramon <i>et al.</i> , 2013; O'Neill <i>et al.</i> , 2014
Sarcoma Sinovial	↑expressão	Hartel <i>et al.</i> , 2007
Tireóide	↑expressão	Lin <i>et al.</i> , 2014
Tumores endócrinos pancreáticos	↓expressão	Maitra <i>et al.</i> , 2003; Goto <i>et al.</i> , 2004; Ali <i>et al.</i> , 2006
Tumores neuroendócrinos cutâneos	↓expressão	Terada <i>et al.</i> , 2013
Tumores fibrosos solitários	↑expressão	Conzo <i>et al.</i> , 2014
Vesícula biliar	↑expressão	Choi <i>et al.</i> , 2004

Embora a detecção de CD99 em tecidos neoplásicos seja ampla, pouco se tem explorado em relação à expressão de CD99 e a transformação e progressão tumoral. Nos diversos tipos de câncer em que CD99 foi detectado, sua presença foi associada tanto a uma possível progressão quanto a supressão tumoral, demonstrando a grande complexidade e papel multifacetado desta proteína. Estudo *in vitro* utilizando linhagens celulares de câncer de próstata e osteossarcoma mostrou que a expressão diferencial das isoformas de CD99 determina características biológicas distintas, afetando de maneira oposta processos celulares cruciais para o desenvolvimento neoplásico (Scotlandi *et al.*, 2007). Ambas isoformas podem tanto ativar quanto reprimir a atividade quinase da família de proteínas Src, proporcionando assim uma base conceitual inicial para as funções das isoformas de CD99 na modulação da migração celular, metástase, adesão celular, organização do citoesqueleto assim como, resistência ao processo de *anoikis* - processo de morte por perda de adesão a matriz extracelular (Paoli *et al.*, 2013). O resíduo Ser168, localizado na região citoplasmática desta proteína e presente apenas na isoforma I de CD99, foi descrito como essencial para que a proteína desempenhe as funções relacionadas à oncosupressão, uma vez que células desprovidas deste resíduo de aminoácido, tal como aquelas que expressam apenas a isoforma II de CD99, puderam recuperar ou melhorar sua capacidade de migração e metástase (Scotlandi *et al.*, 2007).

O papel de CD99 também foi abordado em câncer de mama indicando uma atuação mais comum para esta molécula do que se tem postulado (Byun *et al.*, 2006). Em linhagens celulares de câncer de mama a expressão e ativação da isoforma II acarretou na ativação de moléculas tais quais Src, Akt, ERK e JNK, com indução da expressão de fatores de transcrição AP-1 tais como JunD e FosB, levando a um aumento de expressão de metaloproteinases (MMP-9) e, conseqüentemente, maior mobilidade celular e invasão. Com base nesses resultados, sugeriu-se que a expressão e ativação da isoforma II de CD99 foi capaz de acentuar a capacidade invasiva das células de câncer de mama devido ao aumento da expressão de AP-1 através das vias de sinalização JNK e ERK dependente de Akt (Byun *et al.*, 2006). Sendo assim, a ativação de diferentes vias pelas isoformas de CD99, também em linhagens celulares de câncer de mama, ocorreria em decorrência das diferenças estruturais no fragmento intracitoplasmático destas proteínas, uma vez que o mesmo é capaz

de interagir com diversas moléculas sinalizadoras intracelulares como foi demonstrado em osteosarcoma e câncer de próstata (Scotlandi *et al.*, 2007).

Estudo utilizando *microarrays* de oligonucleotídeos realizado em tumores pancreáticos endócrinos mostrou que em 91% dos casos analisados houve redução ou perda da expressão de CD99 nos tecidos tumorais quando comparado aos controles não neoplásicos, indicando, assim, um possível papel de CD99 como supressor tumoral neste tipo neoplásico (Maitra *et al.*, 2003).

Em osteossarcomas, que apresentam fraca ou nula expressão de CD99, Manara e colaboradores (2006) propuseram que esta proteína atuaria estimulando a atividade de caveolina-1 que, por sua vez, recrutaria c-Src para as invaginações da membrana plasmática denominada cavéolos, reduzindo assim a atividade quinase de c-Src pela formação do complexo CD99/caveolina-1/c-Src. A ativação constitutiva da via c-Src, bem como a da Wnt, estaria relacionada à transformação celular maligna pela modulação da migração, progressão do ciclo celular, além da inibição da própria caveolina-1. Desta maneira, CD99 poderia estar relacionada ao desenvolvimento do fenótipo maligno em osteossarcomas, uma vez que sua expressão encontra-se ausente ou significativamente reduzida neste tipo tumoral (Manara *et al.*, 2006).

Em recente publicação, Sciandra e colaboradores (2014) demonstraram que a restauração da expressão da proteína CD99 a níveis fisiológicos em células de osteosarcoma alterou o *status* celular proliferativo favorecendo a obtenção de um fenótipo osteoblástico terminalmente diferenciado, minimizando assim o fenótipo tumoral. CD99 estimulou vias de sinalização que tem como alvo final as moléculas ERK 1/2 na membrana/citoplasma celular com posterior ativação de RUNX2 e AP-1. Assim, a sinalização via MAPK/ERK conectaria CD99 aos principais fatores de transcrição osteogênicos, acarretando em um aumento na expressão de genes diretamente envolvidos na osteoblastogênese (Sciandra *et al.*, 2014).

Rocchi e colaboradores (2010) descreveram que a modulação da expressão de CD99 foi capaz de modificar significativamente o crescimento celular independente de ancoragem, bem como a migração celular e a habilidade na formação de metástases, bloqueando a transformação celular em direção ao fenótipo oncogênico (Rocchi *et al.*, 2010). O

silenciamento transiente de CD99 em linhagens celulares de Sarcoma de Ewing acarretou em inibição da sinalização mediada por PI3K/Akt com bloqueio na progressão do ciclo celular e aumento da expressão dos inibidores de proliferação p21 e p27 (Rocchi *et al.*, 2010).

A diminuição na expressão de CD99 contribuiu para a aquisição do fenótipo maligno em células Reed-Sternberg de linfoma Hodgkin. Neste tipo tumoral CD99 controlaria a expressão do microRNA miR-9, o qual teria como alvo o repressor transcricional PRDM1/BLIMP1, responsável pela diferenciação terminal das células B em células plasmáticas (Huang *et al.*, 2012).

Seol e colaboradores observaram *in vitro* um aumento na capacidade de migração e invasão, assim como alterações morfológicas e aumento da adesão em linhagens celulares estabelecidas de GBMs nas quais realizaram-se a expressão e ativação da proteína CD99. Além disso, observou-se nestas células um aumento na atividade de RAC e uma diminuição na atividade de Rho, sugerindo um potencial mecanismo pelo qual CD99 influenciaria o remodelamento do citoesqueleto de actina (Seol *et al.*, 2012).

A expressão diferencial de produtos alternativos de splicing é uma característica fisiológica e patológica de diversas moléculas de adesão celular. Entretanto, devido a um restrito padrão de expressão, a proteína CD99 foi estudada de maneira limitada, de forma que as vias de sinalização moduladas por esta molécula e sua potencial participação como um agente oncogênico ou supressor tumoral não foram completamente exploradas, gerando evidências conflitantes para o envolvimento de CD99 na progressão maligna, invasão e metástase. Assim, a elucidação da relação entre a expressão da proteína CD99 e o desenvolvimento tumoral é importante para a identificação de genes que possam servir tanto como alvos terapêuticos ou como fatores preditivos de prognóstico.

Desta maneira, o presente projeto tem como proposta avaliar a expressão do gene e da proteína CD99 em astrocitomas de diferentes graus de malignidade, bem como em linhagens celulares estabelecidas de GBMs, a fim de se verificar o papel funcional desempenhado em vias de sinalização que levem a tumorigênese e progressão destes tipos de tumores.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Neste projeto propõe-se avaliar a expressão de CD99 em tumores astrocíticos de diferentes graus de malignidade e verificar seu papel em vias de sinalização que possam contribuir para a transformação e aquisição do fenótipo maligno em astrocitomas com o uso de modelo celular de GBM.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a expressão relativa de *CD99* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.
- ✓ Avaliar a expressão e localização da proteína *CD99* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e em linhagens celulares de GBM.
- ✓ Realizar o silenciamento de *CD99* em linhagens celulares de GBM para analisar a função de *CD99* na proliferação celular, migração celular e morfologia celular.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Seleção dos genes

A seleção de genes específicos de placenta foi realizada utilizando a interface do banco de dados de MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing Technology*) do BRAIN (Bioinformatics Resources for the Analysis of Information on Neoplasia): <https://www2.licr.org/BRAIN/ImportGeneList.php> a fim de se gerar uma lista de genes especificamente expressos (Jongeneel *et al.*, 2005). Além disso, outra lista foi gerada com genes expressos em bibliotecas de tecidos tumorais e em linhagens celulares de células tumorais (mama, cólon, pulmão e melanoma), mas não expressos nos respectivos tecidos normais. De acordo com a intersecção destas duas listas, foram selecionados genes de acordo com o perfil de expressão em placenta e tecidos normais e tumorais utilizando os bancos de dados de EST e SAGE no site do CGAP (<http://cgap.nci.nih.gov/>). Para refinar ainda mais a seleção dos genes, foram também utilizados os dados de *microarray* de GBM e tecido cerebral não neoplásico (CodeLink, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) produzidos pelo grupo (Okamoto *et al.*, 2007; Marie *et al.*, 2008).

3.2. Casuística

As amostras utilizadas no presente estudo foram coletadas durante procedimento cirúrgico e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido após ressecção realizada pelo Grupo de Tumores Encefálicos e Metástases e da Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Amostras de astrocitomas de diferentes graus (astrocitomas grau I, II, III e GBMs) e de tecidos não neoplásicos do SNC, obtidas do lobo temporal de pacientes com epilepsia, foram coletadas imediatamente após ressecção pelo Grupo de Epilepsia da mesma Divisão, congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido até a análise. Todos os tecidos utilizados possuem confirmação histopatológica pela 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) sob o número de protocolo 373/02 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 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) número 56989-7: “Estudo da expressão aberrante em tumores do sistema nervoso central de genes envolvidos em placenta”, aprovado pela CAPPesq sob o número de protocolo 0995/06 (Anexo 1). Os consentimentos pós-informado (Anexo 2) foram obtidos de todos os pacientes com tumor e epilepsia ou de seus reponsáveis legais e tem sido acompanhados clinicamente com protocolos padronizados para quimioterapia e radioterapia, bem como evolução por neuroimagem.

A casuística deste projeto consiste em um total de 169 amostras subdividas em:

- 19 tecidos controles não neoplásicos;
- 23 astrocitomas pilocíticos (grau I);
- 26 astrocitomas difusos (grau II);
- 17 astrocitomas anaplásicos (grau III);
- 84 GBMs (grau IV).

3.3. Linhagens celulares

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens celulares estabelecidas de GBM U87MG, T98G e A172. Estas células já fazem parte do banco de linhagens celulares do Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Departamento de Neurologia (LIM15) da FMUSP.

- **U87MG**: linhagem celular com propriedade de crescimento aderente, morfologia epitelial, potencial invasivo quando cultivada em matrigel.
- **T98G**: linhagem celular derivada GBM com propriedade de crescimento aderente, morfologia fibroblastóide, potencial altamente invasivo quando cultivada em matrigel.

- **A172**: linhagem celular com propriedade de crescimento aderente, morfologia epitelial, apresenta comportamento não invasivo quando cultivada em matrigel.

3.4. Cultivo celular

As células previamente congeladas em nitrogênio líquido foram cultivadas em monocamada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Life Technologies, Rockville, MD, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies) e antibiótico-antimicótico nas concentrações de 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 0,25µg/mL de fungizona (Life Technologies).

As células foram mantidas em pH e temperatura fisiológicos por meio da manutenção em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Quando atingiram o estado de semiconfluência foram posteriormente subcultivadas e preparadas para os experimentos. Para a realização dos ensaios as células foram desagregadas, utilizando-se tripsina/EDTA, centrifugadas e ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (Life Technologies).

A viabilidade celular foi quantificada pelo método de exclusão por azul de Tripán (Freshney, 1987) em contador automático de células Countess (Life Technologies). O método de exclusão por azul de Tripán é capaz de distinguir as células pela viabilidade, uma vez que as células viáveis apresentam membranas celulares íntegras que impedem a passagem do corante azul de Tripán. Desta maneira, as células viáveis apresentam-se translúcidas e brilhantes na presença do corante. Entretanto, as células inviáveis apresentam-se com uma coloração azulada já que há passagem do corante azul de Tripán pela membrana e, consequentemente, coloração do citoplasma celular. O contador automático de células Countess (Life Technologies) realiza esta distinção entre células coradas e não coradas pelo azul de Tripán fornecendo, desta maneira, uma quantificação da viabilidade das amostras celulares.

Os estoques celulares foram congelados em meio de congelamento contendo 50% de meio DMEM, 40% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como agente crioprotetor e armazenados em nitrogênio líquido.

3.5. Imunohistoquímica

A casuística utilizada para a análise de imunohistoquímica foi composta por 6 tecidos controles não neoplásicos, 6 astrocitomas pilocíticos (grau I), 6 astrocitomas difusos (grau II), 5 astrocitomas anaplásicos (grau III) e 11 GBMs (grau IV).

As linhagens celulares U87MG, T98G e A172 também foram analisadas. Precipitados das células foram fixados e incluídos em parafina.

Para a análise da expressão proteica por imunohistoquímica, cortes de 5µm de tecidos incluídos em parafina em lâminas silanizadas foram desparafinizados, reidratados em soluções crescentes de xilol e álcool e submetidos à recuperação antigênica por calor (122°C, 3 min) em tampão citrato 10mM, pH 6,0. Em seguida, as lâminas foram bloqueadas e incubadas com anticorpo anti-CD99 (anticorpo monoclonal produzido em rato, clone DN16, diluição 1:400, Abcam, Reino Unido), a 16-20 °C durante 16 h. A reação foi detectada utilizando-se o kit comercial Novolink (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) em temperatura ambiente utilizando 3'3'-diaminobenzidine (DAB) como cromógeno. Os núcleos foram contra corados com Hematoxilina de Harris.

A análise semi-quantitativa foi realizada por dois observadores independentes de acordo com os seguintes critérios:

- intensidade da coloração: 0: negativo, 1: fraco, 2: moderado e 3: intenso.
- percentagem de células marcadas: 0: negativo, 0,5: menos de 10% das estruturas marcadas, 1: 10 a 25% das estruturas marcadas, 2: 26 a 50% das estruturas marcadas, 3: 51 a 75% das estruturas marcadas e 4: 76 a 100% das estruturas marcadas.

Para as amostras de tecido controle não neoplásico apenas a imunomarcção de células da glia foi considerada para a análise. A pontuação final foi obtida pelo produto da intensidade pela porcentagem de células marcadas, podendo, assim, variar de 0 a 12. Apenas pontuações de imunomarcção maiores ou iguais a 2 foram interpretadas como positiva. Fotomicrografias digitais representativas foram capturadas e processadas utilizando-se o aparelho Picasa 3 (Google, EUA).

3.6. Imunofluorescência

Para a reação de imunofluorescência as células foram plaqueadas em lamínulas recobertas com poli-lisina e fixadas incubando-se com paraformaldeído 4% em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. A solução fixadora foi removida cuidadosamente e cada poço lavado três vezes com PBS por 10 minutos. Em seguida, realizou-se bloqueio dos sítios inespecíficos e permeabilização celular incubando-se 1 hora a temperatura ambiente na presença de uma solução contendo 4% de soro de cabra e 1% de Triton X-100 em PBS. A solução bloqueadora foi removida cuidadosamente e cada poço lavado novamente três vezes com PBS. Posteriormente, incubaram-se as lamínulas com o anticorpo primário anti-CD99 (1:800) diluído em uma solução de PBS contendo 1% de Triton X-100 em câmara úmida por 18 h e a 4°C. A solução foi removida cuidadosamente e cada poço lavado cinco vezes com PBS por 10 minutos. Em seguida incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado à fluoresceína (Alexa Fluor 488 – verde, Life Technologies) (1:150) diluído em uma solução de PBS contendo 4% de soro de cabra e 1% de Triton X-100. Neste momento, os núcleos foram marcados através da adição, nesta mesma solução, do corante DAPI (diamidino-2-fenil-indole, Life Technologies). A solução foi removida cuidadosamente e cada poço lavado cinco vezes com PBS por 10 minutos. Controles negativos incluíam a reação completa, com ausência do anticorpo primário. A documentação e análise das lâminas foram realizadas com a utilização no sistema confocal Carl Zeiss LSM510 Meta/UV (Oberkochen, Alemanha).

3.7. Extração de RNA total

Os tecidos foram analisados em corte de 4 µm por coloração com hematoxilina e eosina (HE) a fim de se verificar a qualidade do mesmo. Para amostras tumorais, porções de tecidos não tumorais (tecido normal ou necrose) foram dissecadas previamente à extração de RNA total. As extrações de RNA total de tecido normal e neoplásico, assim como de cultura de células, foram realizadas com o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante. A qualidade das amostras de RNA foi verificada por

eletroforese em gel de agarose denaturante. As concentrações e pureza foram determinadas por leitura de absorbâncias a 260 nm e 280 nm. Razões A_{260}/A_{280} 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).

3.8. Síntese de cDNA por transcrição reversa

Inicialmente foi realizada uma digestão com DNase (GE Healthcare), para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 1 μg de RNA total por reação, transcriptase reversa SuperScript III, inibidor de RNase (RNase OUT), oligonucleotídeos randômicos e oligo dT, seguindo-se as recomendações do fabricante (Life Technologies). Após a transcrição reversa, o cDNA obtido foi tratado com 1U de RNase H (Life Technologies) a 37°C por 30 minutos e 72°C por 10 minutos para eliminar eventuais híbridos formados. Em seguida, o cDNA foi diluído em tampão Tris-EDTA (TE) e armazenado a -20°C para posterior utilização nas reações de análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.

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

Os níveis de expressão relativa dos genes selecionados nas amostras tumorais e controles não neoplásicos foram determinados por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Os dados quantitativos referentes à análise da expressão gênica dos genes selecionados foram normalizados em relação a média geométrica de três genes de referência: cassete de ligação de ATP, subfamília G, membro 2 (*BCRP*), glucuronidase beta (*GUSB*) e hipoxantina fosforribosiltransferase (*HPRT*) (Vandesompele *et al.*, 2002; Kok *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2009).

Os *primers* utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram específicos para os genes estudados. Os *primers* foram desenhados em éxons diferentes, eliminando o risco de possíveis amplificações de produtos referentes ao DNA

genômico. Além disso, alguns outros critérios foram utilizados para o desenho dos *primers* com o objetivo de garantir a eficiência e a especificidade das reações: maior proximidade da extremidade 3' do gene; proporção CG em torno de 50% do total de bases; tamanho do *primer* entre 20-25pb; temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C, com diferença de temperatura preferencialmente de até 1°C entre o par de *primers*; limite de três bases repetidas em sequência; ausência de estruturas secundárias como “*hairpins*”, homo e heterodímeros; amplificação de um produto de tamanho entre 80-120pb e balanço 3:2 da proporção GC:AT das cinco últimas bases na extremidade 3' do gene, dando preferência para que haja duas bases A/T nesta extremidade. Para checagem da temperatura de anelamento, presença de estruturas secundárias e proporção GC, foi utilizado o programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os *primers* desenhados foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA). A Tabela 3 apresenta as sequências de nucleotídeos de *primers* específicos para a análise de PCR quantitativo em tempo real, bem como o tamanho dos produtos de amplificação.

As reações foram realizadas pelo método de incorporação de Sybr Green, em aparelho ABI 7500 (Life Technologies). As reações foram realizadas em duplicatas, em um volume final de 12µL, contendo 3µL da fita molde (cDNA), 6µL de SYBR Green I Master Mix (Life Technologies) e 3µL de par de *primers* em uma concentração otimizada. As condições de amplificação foram: incubação a 50°C por 2 minutos para ativação da uracil N-glicosilase, ativação da DNA polimerase a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 (desnaturação) e 60° por 60 segundos (anelamento e extensão dos *primers*). A amplificação de produto único foi confirmada por meio da análise de suas curvas de dissociação. Os produtos de PCR também foram analisados por eletroforese em gel de agarose, e 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 concentrações finais de *primers* testadas foram: 100nM, 200nM, 400nM e 600nM.

As eficiências de amplificação foram calculadas ($E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$) utilizando-se diluições seriadas de um *pool* de cDNAs de GBM. A equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizada para o

cálculo da expressão relativa gênica para $E=100\pm 10\%$, onde $\Delta C_t = \text{média } C_t \text{ gene} - \text{média geométrica do } C_t \text{ dos três normalizadores}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Para as linhagens celulares, *HPRT* foi utilizado como controle endógeno e a análise do silenciamento da expressão de *CD99* foi realizada em relação ao controle NTC (*Non-Targeting Control*).

Tabela 3. Tamanho do produto e sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para as reações de PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Tamanho do produto (pb)	Orientação	Sequências (5' - 3')
<i>BCRP</i>	67	<i>Senso</i>	CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT
		<i>Antisenso</i>	CCTGCGATGGCGTTCAC
<i>CCNB1IP1</i>	88	<i>Senso</i>	GCACAGAACTCAGTCCATCA
		<i>Antisenso</i>	CTCGGGAGCTAATGTCCAACA
<i>CD99</i>	113	<i>Senso</i>	GATTTATCCGATGCCCTTCCT
		<i>Antisenso</i>	TTTTCTCCATCAACAACAGCATC
<i>CNN3</i>	98	<i>Senso</i>	AGAGGTGACAGGCATGAGCA
		<i>Antisenso</i>	CTGAGCCTGGCTGTAGCTTGT
<i>EIF4G2</i>	113	<i>Senso</i>	GGCCTGCTCAGTCGTTCTTA
		<i>Antisenso</i>	TCCCAGAGGTGGTGTGTTGAGT
<i>GUSB</i>	101	<i>Senso</i>	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT
		<i>Antisenso</i>	CCGAGTGAAGATCCCCCTTTTAA
<i>HPRT</i>	116	<i>Senso</i>	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT
		<i>Antisenso</i>	GAGACACAGAGGGCTACAA
<i>MAPKAP1</i>	110	<i>Senso</i>	CTGCTCTGTGCCTGTGACCTT
		<i>Antisenso</i>	GCGTCCGATTCAAAGTAGAGGT
<i>MIF</i>	88	<i>Senso</i>	GGTGTCCGAGAAGTCAGGCA
		<i>Antisenso</i>	TGGCAGAAGGACCAGGAGA
<i>PMP22</i>	114	<i>Senso</i>	GAATGCTCCTCCTGTTGCTGA
		<i>Antisenso</i>	CAGAGATCAGTTGCGTGTCCA
<i>RNF5</i>	94	<i>Senso</i>	GGAAGGAGGATGGATTGAGAGA
		<i>Antisenso</i>	GAACTTTGCCACCTTTGAAGA
<i>S100A10</i>	103	<i>Senso</i>	CAAAGTGGGCTTCCAGAGCTTC
		<i>Antisenso</i>	TGCCTACTTCTTTCCCTTCTGC
<i>TEGT</i>	99	<i>Senso</i>	TCTACAGAGCTTCAGTGTGAGAGGAT
		<i>Antisenso</i>	CAAAGTGTGCACTGGTTGTGAA
<i>TNFRSF12A</i>	109	<i>Senso</i>	GCGCTCTGAGCCTGACCTT
		<i>Antisenso</i>	TCTCCGCCGGTCTCCTCTA
<i>UFC1</i>	124	<i>Senso</i>	CCTGAGCTGGATGGAAAGACA
		<i>Antisenso</i>	CCAGAGCCATGAGATGAGCTAGT

3.10. Extração proteica

Para extração de proteínas totais, tanto dos tumores como das linhagens celulares, foi preparado um lisado celular utilizando-se o tampão de lise RIPA (50mM de Tris-HCl pH 7,4, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de NP-40, 0,25% de Na-deoxicolato) com inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). Esta solução ficou em gelo por 15 minutos com agitações a cada 5 minutos no vortex, para completa lise das células. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 13.000 rpm, a 4°C, por 20 minutos. A concentração total de proteína do sobrenadante determinada através do método de Bradford . Foi analisada uma curva padrão com diluições seriadas de albumina bovina nas concentrações de 0 a 2mg/mL. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas em uma placa de 96 poços. A um volume de 5µL das diluições de albumina e dos extratos proteicos diluídos 10 vezes foram adicionados 295µL do Coomassie Plus – *The Better Bradford Assay*^{TM} Kit (Pierce, Rockford, IL). A placa foi incubada protegida da luz, por 10 minutos, a temperatura ambiente. A leitura da placa foi realizada a 595 nm no leitor de placas *Biotrak II Plate Reader* (GE Healthcare). Os valores das absorbâncias da curva padrão foram analisados em um gráfico, e as concentrações dos extratos protéicos determinadas a partir da equação da reta obtida.

3.11. Western blot

Alíquotas com total de 30µg de proteína das amostras foram desnaturados a 95°C por 5 minutos com tampão de Laemmli 4X (7,5 % 2M Tris pH 6,8; 0,5% SDS; 5% azul de bromofenol; 26% glicerol; 16,5% de 2-mercaptoetanol), em um volume apropriado para a concentração final de 1x. Em seguida, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% em tampão de corrida Tris-Glicina (250 mM Tris, 1,92 M Glicina, 1% SDS). A corrida foi realizada a 70V durante 20 minutos e posteriormente a 100V por aproximadamente 2 horas. Após este período, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Pierce) por 50 minutos a 15V, utilizando-se o Trans-Blot SD *Semi-dry Transfer Cell* (Bio-Rad, Hercules, CA) e tampão de transferência (48mM Tris,

39mM Glicina, 0.0375% SDS e 20% de metanol). Em seguida, as membranas foram bloqueadas em solução de 5% de leite desnatado em TBS-T (2,42g/L Tris-Base, 8 g/L NaCl, acrescidos de 0,1% de Tween-20, sob agitação, a 4°C, por 16 horas. A incubação com o anticorpo primário anti-CD99 (anticorpo monoclonal produzido em camundongo, Abcam, clone DN16, diluição 1:1000) e anti- β -actina (anticorpo monoclonal produzido em camundongo, clone AC-74, Sigma-Aldrich, diluição 1:10.000) em solução de bloqueio foi feita durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Após sequência de lavagens de quatro vezes por 5 minutos com TBS-T e uma vez com TBS por 10 minutos, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, 1:1000) por 1,5 h a temperatura ambiente. A detecção das proteínas na membrana foi realizada por quimioluminescência com o reagente *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus* (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) por 5 minutos a temperatura ambiente, seguindo as recomendações do fabricante. A revelação foi realizada em câmara escura com exposição da membrana ao filme de raio-X Amersham Hiperfilm™ ECL (GE Healthcare) por 2-40 minutos a temperatura ambiente. Alternativamente, a quimioluminescência foi detectada em equipamento ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

3.12. Densitometria

As análises semi-quantitativas da expressão proteica foram determinadas por densitometria da intensidade das bandas do Western Blot. Utilizou-se a expressão da proteína β -actina como controle de massa para a normalização dos resultados. As densitometrias foram realizadas utilizando o *software ImageJ Launcher (Image Processing and Analysis in Java, National Institutes of Health, EUA)*.

3.13. Silenciamento do mRNA de CD99 mediante a técnica de RNA de interferência

A análise de função da proteína CD99 foi realizada por meio do silenciamento específico da expressão gênica de *CD99* por siRNA (*small interference RNA*) em linhagens U87MG e A172. A transfecção transitória foi realizada com Lipofectamine RNAiMax (Life

Technologies) e 1nM de RNA de dupla fita de 27 mers para CD99 (5'-CUUUGACUUAGGAGAUGCUGUUGTT-3'). Como controle experimental realizou-se a transfecção com uma mistura de oligonucleotídeos sem homologia com genes humanos (*NTC - Non-Targeting Control*) também na concentração de 1nM. Ambos siRNAs utilizados foram sintetizados pela IDT(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA). Um total de $1,0 \times 10^5$ células foi plaqueado em placas de 6 poços e após 24 horas realizou-se a transfecção. A Lipofectamine e os oligonucleotídeos de siRNA foram diluídos separadamente em Opti-MEN *I Reduced Serum Medium* (Life Technologies) e, incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, misturaram-se ambos os preparados na proporção 1:1 com incubação de 20 minutos a temperatura ambiente. A transfecção foi realizada adicionando a solução, por gotejamento, a cada poço contendo meio DMEM sem SFB. Após 24 horas, foi adicionado o SFB aos poços, na concentração final de 10% e as placas foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por diferentes períodos até o momento de realização dos ensaios. A eficiência do silenciamento foi analisada pelo nível de redução da expressão de CD99, em relação ao controle (NTC), por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) e por Western blot.

3.14. Curvas de proliferação

As células transfectadas 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% de CO₂. Após 2, 4 e 7 dias de transfecção as respectivas células foram tripsinizadas e contadas pelo método de exclusão de células coradas pelo azul de Tripán (Freshney, 1987) em contador automático Countess (Life Technologies). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.15. Ensaio de migração

A capacidade de migração das linhagens celulares em condições basais e após o silenciamento gênico foi avaliada utilizando-se câmaras de migração contendo poros de 8µm

de diâmetro (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Após 48 horas de transfecção as células foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas em meio DMEM suplementado com 1% de SFB. Um total de $2,5 \times 10^4$ células foram adicionadas no compartimento superior da câmara e mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 20 horas. Como quimioatrativo utilizou-se 10% de SFB no compartimento inferior. Após este período as células que não migraram foram removidas da superfície superior da membrana com um bastão com algodão. As células que migraram através da membrana foram fixadas por 15 minutos com paraformaldeído 4% em PBS e coradas por 15 minutos com uma solução de cristal violeta 0,1%. Para a quantificação da migração, 10 campos diferentes de cada membrana foram contados utilizando-se aumento de 40 vezes. Os dados foram expressos como a média das duplicatas do número total de células que migraram em cada campo nas diferentes condições.

3.16. Análise de imunofluorescência em larga escala

Para as análises de fluorescência em larga escala foram plaqueadas 1×10^4 células U87MG em placas de 96 poços 2 dias após o silenciamento de *CD99* e o respectivo controle. Após um período de 3 horas para que as células aderissem, procedeu a imunofluorescência como descrito no item 3.6. O anticorpo primário utilizado na reação de imunofluorescência foi anti-faloidina/FITC (P5282, Sigma-Aldrich, diluição 1:400) com os núcleos marcados com DAPI. Para aquisição das imagens foi utilizado o aparelho ImageXpress Micro Widefield High-Content Imaging System (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) com 20x de magnificação. Um total de 704 células por condição foram analisadas automaticamente pelo *software* MetaXpress (Molecular Devices).

3.17. Análises estatísticas

A análise estatística da expressão gênica relativa em amostras não-neoplásicas e amostras de GBM foi realizada utilizando o teste t de Student. A diferença na expressão gênica e proteica nos astrocitomas de diferentes graus ou nos casos de GBM de acordo com a

localização da lesão, foram avaliada por meio do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn. A curva de sobrevida de Kaplan-Meier foi analisada utilizando o teste *log-rank* (Mantel Cox) e a análise multivariada com o modelo de riscos proporcionais de Cox. O modelo de regressão logística incluiu os seguintes parâmetros: idade ao diagnóstico, sexo (feminino versus masculino), e status de expressão gênica (hiper ou hipoexpressão). Para os ensaios de migração, proliferação e imunofluorescência em larga escala as comparações entre as células transfectadas com siRNA para CD99 e NTC foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os cálculos foram realizados utilizando GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA) e SPSS para Windows, versão 15.0 (Chicago, IL, EUA).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Seleção dos genes com elevada expressão em placenta e astrocitomas

A estratégia utilizada para a seleção de genes específicos de placenta com expressão aumentada em astrocitomas foi utilizar os dados *in silico* de expressão gênica do banco de dados de MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*) do BRAIN (*Bioinformatics Resources for the Analysis of Information on Neoplasia*): <https://www2.licr.org/BRAIN/ImportGeneList.php> (Jongeneel *et al.*, 2005), a fim de se gerar uma lista de genes com alta expressão em placenta. Uma segunda lista de genes expressos em bibliotecas de MPSS de tecidos tumorais e em linhagens de células tumorais (mama, cólon, pulmão e melanoma), mas não expressos nos respectivos tecidos normais também foi gerada (Figura 4). A lista da interseção entre estas resultou em um total de 390 genes e o número de *tags* do banco público de SAGE de todas as bibliotecas de tecidos normais foi anotado. As bibliotecas de SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) utilizadas estão apresentadas no Anexo 4. Os dados de SAGE foram normalizados, dividindo-se o número de *tags* das bibliotecas por 200.000. Os dados das bibliotecas de MPSS foram também normalizados por 200.000 *tags*.

Foi realizada a razão do número de *tags* das bibliotecas de GBM sobre córtex normal de SAGE, bem como a razão das fluorescências normalizadas da média dos três *microarrays* de GBM sobre o pool de tecido cerebral não tumoral gerados no nosso laboratório (Marie *et al.*, 2008; Okamoto *et al.*, 2007). Para a escolha inicial foram adotados os seguintes critérios de exclusão:

- genes com baixa expressão em astrocitomas (175 genes);
- genes codificadores de proteínas ribossomais (25 genes);
- genes codificadores de colágeno (6 genes);
- genes com alta expressão, mas não constante nos dados de *microarray* (19 genes);
- genes não encontrados nos dados de *microarray* (28 genes);
- genes com alta expressão em tecido cerebral não tumoral (79 genes).

Foram selecionados 58 genes com aumento de expressão em placenta, astrocitomas e com baixa expressão em tecido cerebral não tumoral. Foi realizada, então, uma análise da função e localização (preferencialmente membrana) destes genes, bem como a procura por dados publicados na literatura. Os seguintes critérios de exclusão foram adotados:

- genes já descritos com expressão aumentada em astrocitoma (5 genes);
- genes não relacionados com tumorigênese (30 genes).

Os 23 genes restantes foram analisados quanto à expressão em tecidos normais utilizando-se os bancos de dados MPSS e SAGE. Aqueles que apresentaram aumento de expressão em tecidos normais (11 genes) foram excluídos.

Somente 12 genes foram selecionados e passaram para a validação de expressão em astrocitomas por qRT-PCR em uma casuística de 10 amostras de tecido cerebral não tumoral e 20 amostras de GBM. A Tabela 4 apresenta os dados de expressão relativa (média, valores mínimos e máximos) dos 12 genes que apresentaram aumento de expressão em placenta e astrocitomas nas amostras analisadas. Dentre os 12 genes avaliados, *CD99* foi aquele que apresentou o maior valor de expressão média nas amostras de GBM.

Figura 4: Esquema mostrando a estratégia empregada para a seleção de genes específicos com expressão aumentada em placenta e astrocitomas. NN: tecido cerebral não neoplásico; GBM: glioblastoma.

Tabela 4. Análise da expressão dos genes com aumento de expressão em placenta e astrocitomas em 10 amostras de tecido tumoral não neoplásico e 20 glioblastomas (GBMs).

Gene	Não-Tumoral	GBM	<i>p</i>
<i>CCNB1IP1</i>	0,99 (0,43-2,20)	3,44 (1,86-8,54)	<0,0001
<i>CD99</i>	1,11 (0,41-2,71)	111,67 (21,50-225,35)	<0,0001
<i>CNN3</i>	1,06 (0,55-1,95)	22,26 (5,94-57,88)	<0,0001
<i>EIF4G2</i>	1,00 (0,49-1,93)	7,62 (3,06-18,57)	<0,0001
<i>MAPKAP1</i>	0,98 (0,62-1,89)	5,72 (2,71-12,23)	<0,0001
<i>MIF</i>	0,98 (0,63-1,58)	4,79 (2,12-12,56)	<0,0001
<i>PMP22</i>	1,15 (0,46-2,46)	14,05 (1,47-49,01)	<0,0001
<i>RNF5</i>	1,03 (0,35-2,39)	6,89 (1,28-20,92)	0,0001
<i>S100A10</i>	0,96 (0,15-4,63)	35,43 (8,18-111,97)	<0,0001
<i>TEGT</i>	1,11 (0,38-1,77)	5,90 (1,11-14,71)	<0,0001
<i>TNFRSF12A</i>	1,28 (0,47-2,79)	29,14 (0,77-48,28)	<0,0001
<i>UFC1</i>	1,09 (0,42-2,48)	3,54 (2,08-8,06)	<0,0001

Expressão gênica relativa em 10 amostras de tecido tumoral não neoplásico e 20 glioblastomas (GBM). Os valores representam a média da expressão relativa (valores mínimos e máximos em cada grupo de amostra). O gene *HPRT* foi utilizado como gene de referência. Valores em negrito representam o maior valor médio para as amostras de GBM.

4.2. Análise do perfil de expressão de *CD99* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade

Com o objetivo de se investigar um possível envolvimento de *CD99* na tumorigênese de astrocitomas analisou-se a expressão relativa de *CD99* em um número maior de amostras de astrocitomas de diferentes graus (graus I-IV) e tecidos não neoplásicos. Amostras de astrocitomas de diferentes graus de malignidade foram transcritas reversamente e os cDNAs foram analisados por qRT-PCR. Os níveis de expressão relativa foram calculados normalizando o nível de expressão do gene pela expressão dos genes de referência *BCRP*, *GUSB* e *HPRT* para cada amostra. Como mostrado na Figura 5, a expressão relativa de

CD99 apresentou grande variabilidade em todos os graus de astrocitomas, com diferenças significativamente estatísticas quando comparados todos os grupos analisados (não neoplásico e astrocitomas) ($p < 0,0001$). Entre os astrocitomas difusamente infiltrativos, os valores de expressão de *CD99* aumentaram de acordo com o grau de malignidade do tumor infiltrante. Os quatro grupos de astrocitomas apresentaram valores de expressão maiores quando comparados aos das amostras não neoplásicas ($p < 0,0001$ para todos os grupos).

Figura 5: Perfil de expressão de CD99 em astrocitomas e tecido cerebral não neoplásico. A expressão relativa de *CD99* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade em relação ao tecido cerebral não neoplásico foi determinada por qRT-PCR em 19 amostras não neoplásicas (NN), 23 astrocitomas pilocíticos (AGI), 26 astrocitomas difusos (AGII), 17 astrocitomas anaplásicos (AGIII) e 84 glioblastomas (GBMs). A média geométrica dos genes *BCRP*, *GUSB* e *HPRT* foram utilizadas para os cálculos de expressão de cada amostra. As barras horizontais apresentam a expressão relativa média de *CD99* em cada grupo: NN = 1,23; AGI = 16,77; AGII = 7,68; AGIII = 14,62; GBM = 17,47. A diferença na expressão gênica relativa entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$, teste de Kruskal–Wallis) e entre o grupo NN e cada grupo de astrocitomas (***) ($p < 0,0001$, teste de Dunn).

Posteriormente, os níveis de expressão de *CD99* foram analisados nas amostras de GBM de acordo com a localização e extensão da lesão deste tipo tumoral considerando-se: 1 para unilobar; 2 para multilobar e 3 para insular como o epicentro da lesão. Os níveis de expressão foram diferentes entre os grupos ($p=0,04977$). Os casos com maior extensão tumoral (multilobar) apresentaram maiores níveis de expressão de *CD99* do que aqueles tumores restritos a um único lóbulo (unilobar), bem como aqueles com localização insular ($p=0,019$ e $p=0,025$, respectivamente) (Figura 6).

Figura 6: Correlação do perfil de expressão de *CD99* com a localização da lesão em GBMs. Gráficos representativos da expressão relativa de *CD99* de acordo com a localização e extensão da lesão em GBMs categorizadas como unilobular (1, $n = 34$), multilobular (2, dois ou mais lóbulos, $n = 40$) e insular como o epicentro da lesão (3, $n = 8$). As caixas compreendem desde o percentil 25 até o percentil 75 com as barras representando a mediana de cada grupo. Os valores obtidos foram estatisticamente significativos entre os grupos 1 e 2 (** $p = 0,019$) assim como entre os grupos 2 e 3 (** $p = 0,025$).

Os níveis de expressão de *CD99* para os casos de GBM também foram correlacionados com a análise clínica de sobrevida global, entretanto não houve diferença no prognóstico do paciente com GBM quando comparamos grupos com alta e baixa expressão deste gene.

4.3. Análise da expressão proteica de CD99 em astrocitomas de diferentes graus de malignidade

Tecidos tumorais de astrocitomas de diferentes graus (I-IV) e controles não neoplásicos foram submetidos a extração de proteínas totais para posterior análise por Western blot com o anticorpo anti-CD99. Para tanto, foram selecionados 5 casos controles não neoplásicos, 4 astrocitomas pilocíticos (grau I), 4 astrocitomas difusos (grau II), 2 astrocitomas anaplásicos (grau III) e 6 GBMs (grau IV). As amostras de GBM apresentaram maior expressão da proteína CD99 quando comparadas aos astrocitomas de baixo grau e amostras controle não neoplásicas confirmando os resultados obtidos para expressão do mRNA de *CD99*.

Figura 7: Perfil de expressão proteica de CD99 em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecido cerebral não neoplásico. A. Avaliação da expressão proteica de

CD99 por Western blot em 5 amostras de tecido cerebral não neoplásico (NN), 4 astrocitomas pilocíticos (AGI), 4 astrocitomas difusos (AGII), 2 astrocitomas anaplásicos (AGIII) e 6 glioblastomas (GBMs) utilizando os anticorpos anti-CD99 e anti- β -actina. B. Densitometria relativa de CD99 em relação a β -actina. As linhas horizontais representam as médias de cada grupo.

A expressão diferencial de CD99 de acordo com o aumento da malignidade observada na expressão gênica foi confirmada na expressão da proteína. Os casos de GBMs apresentaram maiores expressões quando comparados com os astrocitomas de menor grau e os tecidos cerebrais não neoplásicos.

4.4. Imunolocalização de CD99 em astrocitomas de diferentes graus de malignidade

A análise da expressão e localização da proteína CD99 foi analisada nos astrocitomas de diferentes graus de malignidade e amostras controle não neoplásicas por imunohistoquímica em: 6 casos controles não neoplásicos, 6 astrocitomas pilocíticos (grau I), 6 astrocitomas difusos (grau II), 5 astrocitomas anaplásicos (grau III) e 11 GBMs (grau IV). A Figura 8 apresenta casos representativos da imunorreatividade do anticorpo anti-CD99, sendo que tumores malignos apresentaram prevalência na expressão de CD99 em relação ao tecido controle não neoplásico. A expressão da proteína CD99 apresentou-se menos intensa no tecido cerebral não neoplásico com maior imunorreatividade nos astrocitomas de acordo ao grau de malignidade.

Figura 8. Fotomicroscopias óticas representativas de imunohistoquímica para CD99 em astrocitomas e tecido cerebral não neoplásico. A expressão e localização de CD99 foram analisadas por imunohistoquímica em tecido cerebral não neoplásico (NN),

astrocitoma pilocítico (AGI), astrocitoma difuso (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (GBM). Aumento de 400x.

A expressão da proteína CD99 obtida na reação de imunohistoquímica foi analisada de maneira qualitativa e semiquantitativa a fim de se comparar os níveis de expressão entre os astrocitomas de diferentes graus de malignidade. Para tanto, considerou-se o produto da intensidade da coloração pela porcentagem de células com marcação positiva, de acordo a pontuação descrita na seção 3.5 de Materiais e Métodos, para o cálculo da imunorreatividade do anticorpo.

A Figura 9 apresenta a análise semiquantitativa da reação de imunohistoquímica correlacionada ao local de marcação das células (núcleo, citoplasma ou membrana citoplasmática). Notavelmente, quando a localização de CD99 foi analisada em relação ao grau do tumor, observou-se que a expressão de CD99 nas amostras de GBM está localizada principalmente no citoplasma e membrana plasmática. Em contraste aos gliomas malignos, nenhuma coloração na membrana das células gliais não neoplásicas foi observada, embora os astrocitomas pilocíticos tenham exibido também marcação nuclear.

A localização de CD99 entre os grupos de astrocitomas e as amostras controles foi significativamente diferente no que diz respeito à localização nuclear ($p=0,0010$), citoplasmática ($p<0,0001$) e membrana plasmática ($p<0,0001$).

Figura 9. Análise semi-quantitativa da imunolocalização de CD99. A expressão e localização de CD99 foram analisadas por imunohistoquímica em 5 amostras de tecido cerebral não neoplásico (NN), 4 astrocitomas pilocíticos (AGI), 4 astrocitomas difusos (AGII), 2 astrocitomas anaplásicos (AGIII) e 6 glioblastomas (GBMs). Os gráficos apresentam a análise semiquantitativa referente ao produto de intensidade da coloração pela porcentagem de células com marcação positiva para o anticorpo anti-CD99 no núcleo (A), citoplasma (B) e membrana plasmática (C). As barras horizontais representam a média do *score* imunoistoquímico de cada grupo. A diferença na expressão proteica entre os grupos

foi estatisticamente significativa para a marcação nuclear ($p=0,0010$) e também para a marcação citoplasmática e de membrana ($p<0,0001$ para ambas); teste de Kruskal–Wallis. Para as amostras controles, a marcação de CD99 foi analisada nas células glias.

4.5. Imunolocalização de CD99 em linhagens celulares de GBM

A expressão e localização da proteína CD99 foram também analisadas nas linhagens celulares de GBM U87MG, A172 e T98G por imunohistoquímica. A imunolocalização de CD99 nas linhagens celulares U87MG e A172 foi semelhante ao observado nas amostras de GBM, com a proteína apresentando acentuada expressão na região de membrana plasmática (Figura 10C e 10B, respectivamente). Entretanto, a linhagem celular T98G apresentou marcação fraca quando comparada as outras linhagens, com poucas células apresentando marcação no citoplasma e fraca marcação de CD99 na membrana citoplasmática (Figura 10A). Em nenhuma das três linhagens celulares analisadas CD99 localizou-se no núcleo.

Figura 10. Fotomicroscopias óticas representativas de imunohistoquímica para CD99 em linhagens celulares de glioblastoma. A expressão e localização de CD99 foram analisadas por imunohistoquímica em linhagens celulares de GBM. Células U87MG (C) e A172 (B) apresentaram marcação na membrana plasmática enquanto que nas células T98G (A) a expressão de CD99 foi fraca, com poucas células apresentando marcação em região de membrana. Aumento de 400x.

4.6. Efeito da expressão basal de CD99 na migração de linhagens celulares de GBM

Analizamos a capacidade de migração das linhagens celulares U87MG, A172 e T98G, uma vez que estas linhagens apresentaram diferentes padrões de imunolocalização para a proteína CD99. As células foram avaliadas utilizando-se câmaras de migração. As linhagens U87MG e A172 apresentaram maior capacidade migratória basal (Figura 11C e 11B, respectivamente) em comparação a linhagem celular T98 (Figura 11A).

Considerando o potencial migratório basal das linhagens celulares U87MG e A172 assim como o padrão de imunolocalização da proteína CD99, semelhante ao observado nos tecidos de GBM com acentuada expressão na região de membrana plasmática, ambas as linhagens celulares foram selecionadas para os experimentos *in vitro* de silenciamento da expressão gênica de *CD99*.

Figura 11. Efeito da expressão de CD99 na capacidade migratória de linhagens celulares de GBM. A capacidade de migração basal das linhagens celulares U87MG, A172 e T98G. Células U87MG (C) e A172 (B) apresentaram maior capacidade migratória que as células T98G (A). Fotomicroscopia ótica representativa da quantidade de células migratórias por campo. Aumento de 40x.

4.7. Análise da expressão de *CD99* nas linhagens celulares U87MG e A172 após silenciamento gênico

Para estudar o papel de *CD99* nas linhagens de GBM a estratégia empregada foi a de silenciamento gênico transitório por transfecção com siRNA. Primeiramente foi feita a padronização do ensaio de siRNA nas células U87MG e A172 utilizando oligos para *CD99* e controles NTC. Células A172 e U87MG foram transfectadas e mantidas em condições de cultura celular por 2, 4 e 7 dias. Os níveis de inibição da expressão do mRNA de *CD99* foram analisados (Figura 12). Verificou-se que a diminuição da expressão de *CD99* foi tempo-dependente em ambas as linhagens, com maior inibição da expressão entre os dias 2 e 4 após a transfecção. Neste período, as células U87MG apresentaram, respectivamente, 99% e 98% de inibição em relação ao controle NTC, enquanto que as células A172 exibiram 98% de inibição até o dia 4.

Figura 12: Expressão relativa de *CD99* nas linhagens celulares A172 e U87MG em diferentes dias após silenciamento com siRNA. Expressão de *CD99* 2, 4 e 7 após transfecção com siRNA. Os cálculos de expressão foram realizados em relação ao controle NTC.

Os níveis de expressão proteica de CD99 após silenciamento por siRNA foram confirmados por Western blot. A Figura 13 apresenta os dados de inibição da expressão proteica de CD99 nas linhagens U87MG e A172 após o silenciamento gênico.

Figura 13: Expressão de CD99 nas linhagens celulares U87MG e A172 após silenciamento com siRNA. Avaliação da expressão proteica de CD99 por Western blot após transfecção com siRNA nas linhagens celulares A172 e U87MG utilizando os anticorpos anti-CD99 e anti-β-actina.

4.8. Efeito do silenciamento de CD99 na proliferação das linhagens U87MG e A172

Proliferação celular descontrolada e sobrevivência, ou seja, resistência aos mecanismos de morte celular são recursos que as células neoplásicas utilizam para ressaltar o crescimento tumoral. Assim, as células transfectadas foram mantidas em condições de cultura celular por 2, 4 e 7 dias após a transfecção a fim de se avaliar o impacto do silenciamento de *CD99* na capacidade proliferativa. A Figura 14A apresenta os resultados obtidos para a linhagem U87MG, na qual podemos observar uma diminuição da proliferação nas células silenciadas para *CD99* em relação ao controle após 4 e 7 dias de silenciamento. Na linhagem A172 o impacto do silenciamento na capacidade proliferativa mostrou-se mais significativo, com diminuição da proliferação 2, 4 e 7 dias após a transfecção (Figura 14B).

Figura 14. Efeito do silenciamento de CD99 na proliferação das linhagens celulares U87MG e A172. Gráfico representativo da porcentagem de células viáveis 2, 4 e 7 dias após o silenciamento de *CD99* em células U87MG (A) e A172 (B) após o silenciamento de *CD99*. *** $p < 0,001$; * $p < 0,01$.

4.9. Efeito do silenciamento de CD99 na migração das linhagens U87MG e A172

A capacidade de migração foi avaliada nas linhagens celulares após 2 dias de silenciamento gênico de *CD99*. Células U87MG silenciadas para expressão de *CD99* apresentaram redução estatisticamente significativa em sua capacidade migratória com relação às células controle (Figura 15A). A linhagem A172 apresenta uma capacidade

migratória inferior à linhagem U87MG. Assim, avaliamos se o silenciamento de CD99 alteraria esta característica desta célula. Como apresentado na Figura 15B, a redução na expressão de *CD99* diminuiu significativamente a capacidade migratória das células A172. Esses resultados, quando avaliados em conjunto com os dados de expressão proteica, indicam que as diferenças no grau de expressão de CD99 podem refletir também as diferenças na biologia de cada uma dessas linhagens.

Figura 15. Avaliação do comportamento migratório das linhagens celulares U87MG e A172 após o silenciamento de *CD99*. Gráficos representativos da média do total de células silenciadas para *CD99* (siRNA *CD99*) e controle (NTC) que migraram por campo. *** $p < 0,0001$, teste Mann-Whitney.

4.10. Análise da localização de CD99 na linhagem celular U87MG

A literatura demonstra que em células tanto do sistema imune quanto do hematopoiético, em que CD99 exerce papel crucial no processo de diapedese, esta proteína encontra-se localizada no locais de contato célula-célula. Com o objetivo de determinar a localização da proteína CD99 na linhagem celular U87MG, foi realizada imunofluorescência utilizando-se o anticorpo anti-CD99. Observou-se uma marcação predominante membranar, com marcação mais acentuada e granulação nas estruturas denominadas lamelipódios

(bordas celulares) fundamentais para a característica migratória desta linhagem celular (Figura 16).

Figura 16. Análise da expressão e localização da proteína CD99 em células U87MG. Fotomicrografia mostrando a expressão e localização da proteína CD99 nas células U87MG. Anti-CD99 e anti-mouse Alexa Fluor 488 (verde). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). As células foram analisadas por microscopia confocal utilizando-se objetiva de 63x.

4.11. Silenciamento de *CD99* acarreta alterações morfológicas na linhagem celular U87MG

As alterações na organização do citoesqueleto foram analisadas com marcação do citoesqueleto de actina com faloidina-FITC 2 dias após o silenciamento de *CD99*, seguida por análise em larga escala de parâmetros celulares como: área nuclear, área celular e intensidade de fluorescência.

O silenciamento de *CD99* nas células U87MG promoveu alterações na morfologia da célula (Figura 17A) e aumento na intensidade de fluorescência para a marcação com faloidina-FITC (Figura 17B) indicando uma possível reorganização do citoesqueleto de actina após a supressão da expressão de *CD99*.

Figura 17. Análise da morfologia celular após silenciamento de *CD99* na linhagem U87MG. As células foram analisadas utilizando-se o aparelho ImageXpress Micro Widefield High-Content Imaging System com 20x de magnificação. A. Fotomicrografia mostrando a marcação de faloidina nas células U87MG. Anti-faloidina (verde). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). B. Intensidade média de fluorescência para a marcação de faloidina. C. Área celular média em μm^2 . Um total de 704 células por condição foram analisadas automaticamente pelo *software* MetaXpress. *** $p < 0,0001$

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Microambientes tumorais consistem em sistemas complexos, cujas células apresentam vias de sinalizações desordenadas o suficiente para dificultar o tratamento, mas por outro lado ordenadas o bastante para que haja a comunicação intercelular. Os mecanismos observados na proliferação, invasão e refratariedade aos tratamentos apresentados pelos GBMs não fogem a esta regra. A alta complexidade na desregulação das vias de transdução de sinais associada à enorme plasticidade apresentada pelos GBMs contribuem para que as maiorias dos estudos com alvos moleculares como terapias anticâncer se tornassem pouco promissoras. Considerando a elevada agressividade deste tipo tumoral, somada à baixa sobrevida global dos pacientes portadores de GBMs e a atual escassez de opções terapêuticas para o tratamento e melhoria na qualidade de vida dos indivíduos acometidos, faz-se necessário investigar novas alterações em vias moleculares em astrocitomas que possam servir como futuras opções terapêuticas. Embora o câncer exiba aspectos muito heterogêneos, a maioria dos tumores malignos compartilha diversas características, como descontrole da sua capacidade proliferativa associada a uma crescente resistência a morte celular (Hanahan & Weinberg, 2011). De fato, a análise do processo tumorigênico revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral, o que na maioria das situações está submetido às sinalizações provenientes das interações entre células neoplásicas e o microambiente celular no qual tais células transformadas estão inseridas (Sayers, 2011).

Embora a placenta seja um tecido normal, é evidente que as células trofoblásticas compartilham inúmeros mecanismos moleculares com as células tumorais, que incluem a capacidade de rápida proliferação, invasão de tecidos adjacentes, migração, formação de novos vasos sanguíneos, além da evasão do sistema imune. Desta maneira, a comparação entre placenta e tumores malignos é importante para o nosso conhecimento com relação às moléculas e cascatas de sinalização implicadas nos processos de invasão e migração. A identificação destes elementos podem fornecer novos alvos terapêuticos com possibilidades de aplicações para o diagnóstico e/ou tratamento não apenas do câncer como também da gravidez patológica (Nomura *et al.*, 1998; Ferreti *et al.*, 2007; Holtan *et al.*, 2009).

O presente estudo teve como objetivo identificar *in silico* genes com alta expressão em placenta e diferentes tipos tumorais com foco em astrocitomas. Entre os genes identificados, *CD99* foi selecionado e seu perfil de expressão gênica e proteica analisado em uma série ampliada de astrocitomas. *CD99* é uma glicoproteína transmembrana glicosilada com um domínio extracelular, um domínio transmembranar e um curto domínio intracitoplasmático (Manara *et al.*, 2006) codificada pela região pseudoautosômica dos cromossomos sexuais X e Y (Levy *et al.*, 1979, Goodfellow *et al.*, 1988; Peti *et al.*, 1983; Bantig *et al.*, 1989). Embora *CD99* apresente ampla expressão celular, as vias de sinalização associadas a sua função biológica ainda não estão muito bem estabelecidas (Khunkaewla *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2008). A caracterização da expressão de *CD99* foi realizada em um grande grupo de astrocitomas de diferentes graus de malignidade (150 tecidos distintos) confirmando o aumento da expressão de *CD99* nos astrocitomas difusamente infiltrativos em comparação ao tecido cerebral não neoplásico. Estes resultados foram confirmados por Western blot, sendo que os GBMs, o grupo de astrocitomas de maior malignidade, apresentaram os maiores níveis de expressão da proteína *CD99*. Os resultados de expressão gênica e proteica nos diversos graus de astrocitomas obtidos neste trabalho, somados aos fenômenos de adesão e apoptose, desencadeados pela estimulação desta molécula descrita no sistema hematopoiético, e a escassez de informações funcionais relativas à sua participação no processo tumorigênico dos diferentes tipos de câncer, fez com que *CD99* se apresentasse como uma molécula interessante a ser explorada com perspectivas, inclusive, de utilização terapêutica.

A proteína *CD99* é expressa em uma ampla variedade de tecidos normais, predominantemente linfócitos T, monócitos e células *natural killer* (Ambros *et al.*, 1991; Gordon *et al.*, 1998). Funcionalmente, a proteína *CD99* está implicada em diversos processos celulares, incluindo-se a diferenciação de células hematopoiéticas, proliferação e diapedese (Bernard *et al.*, 2000; Lou *et al.*, 2007), adesão célula-célula e migração (Lou *et al.*, 2007; Pata *et al.*, 2011; Torzicky *et al.*, 2012), indução da apoptose (Alberti *et al.*, 2002; Bixel *et al.*, 2010), manutenção da arquitetura celular (Cerisano *et al.*, 2004) e transporte de proteínas transmembrana (Vestweber, 2007). Por atuar em vias de sinalização que controlam funções celulares como adesão e diferenciação celular, proliferação, migração celular e

arquitetura tecidual e assim modular as interações entre células tumorais e microambiente, não é surpreendente que a expressão de CD99 esteja alterada em diversos tipos de câncer. Além de seu papel fisiológico, a expressão de CD99 tem sido associada a inúmeras neoplasias incluindo angiofibroma (He *et al.*, 2014), angiomiofibroblastoma (Magro *et al.*, 2014), câncer gástrico (Lee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014), câncer de mama (Milanezi *et al.*, 2001; Byun *et al.*, 2006), câncer de pâncreas (Laje *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014), câncer de próstata e testículo (Kommoss *et al.*, 2000; Scotlandi *et al.*, 2007), câncer de pulmão (Yoo *et al.*, 2005; Edlund *et al.*, 2012), carcinoma de vesícula biliar (Choi *et al.*, 2004), condrossarcoma mesenquimal (Brown & Boyle, 2003), hemangioma (Luca *et al.*, 2014), hemangiopericitoma (Michi *et al.*, 2013), hepatoblastoma (Ramsay *et al.*, 2008), leucemia linfoblástica e linfomas (Ambros *et al.*, 1991; Dworzak *et al.*, 1999; Buxton *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012; Terada, 2012; Liu *et al.*, 2013), melanoma (Wilkerson *et al.*, 2006), osteosarcoma (Manara *et al.*, 2006; Scotlandi *et al.*, 2007; Sciandra *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014;), rabdomiosarcomas (Ramani *et al.*, 1993; Folpe *et al.*, 2002), sarcoma sinovial (Hartel *et al.*, 2007), tumores endócrinos pancreáticos (Maitra *et al.*, 2003; Goto *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2006), tumores neuroendócrinos cutâneos (Terada *et al.*, 2013); tumores fibrosos solitários (Conzo *et al.*, 2014), tumores ovarianos (Choi *et al.*, 2000). Embora os dados de expressão de CD99 nas neoplasias do sistema nervoso central sejam escasso, há relatos em ependimomas (Mahfouz *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014), astrocitomas, oligodendrogliomas e PNETs centrais (Ishizawa *et al.*, 2005; Ishizawa *et al.*, 2008; Seol *et al.*, 2012)). Mahfouz e colaboradores descreveram a expressão de CD99 como um bom marcador diagnóstico para a distinção de ependimomas em relação a outros tumores não ependimais inclusive até para diferenciar os vários tipos de ependimomas (Mahfouz *et al.*, 2008). Como demonstrado nesse trabalho, a expressão de CD99 em astrocitomas por imunohistoquímica pode constituir uma ferramenta para distinguir esses tipos de câncer de oligodendrogliomas já que tanto ependimomas como astrocitomas apresentam marcação positiva para CD99. Ishizawa e colaboradores também demonstraram a expressão de CD99 em astrocitomas de todos os graus de malignidade, embora somente localização citoplasmática e de membrana tenha sido observada (Ishizawa *et al.*, 2008). Recentemente, Seol e colaboradores também demonstraram expressão elevada da proteína CD99 em diferentes graus de astrocitomas.

Entretanto, a expressão de CD99 não foi diferente entre os diferentes graus de malignidade tumorais e a localização subcelular não mencionada (Seol *et al.*, 2012). No presente trabalho, analisou-se a expressão e localização de CD99 em relação ao grau do tumor, observando-se que a proteína CD99 nas amostras de GBM está localizada principalmente no citoplasma e membrana plasmática. Em contraste aos gliomas malignos, nenhuma coloração na membrana das células gliais não neoplásicas foi observada, embora os casos de astrocitomas pilocíticos (AGI) tenham exibido intensa marcação nuclear. Embora as diferenças nos níveis de expressão gênica entre os diferentes graus de astrocitoma não tenham sido significativas, a localização subcelular da proteína CD99 foram bem diferentes. Os astrocitomas mais malignos (AGIII e AGIV - GBM) apresentaram marcação principalmente na membrana citoplasmática em contraste aos de menor grau, com marcação predominantemente nuclear (AGI e AGII), resultado que foi semelhante ao padrão observado no tecido cerebral não neoplásico. Marcações citoplasmáticas e de membrana focais e difusas também já foram relatadas para a proteína CD99 em outros tipos de tumores (Gordon *et al.*, 1998; Machen *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2000; Kommoss *et al.*, 2000; Milanezi *et al.*, 2001; Yoo *et al.*, 2005; Hartel *et al.*, 2007). Embora esta alteração na localização da expressão proteica de CD99 de acordo ao grau de malignidade do tumor seja uma observação nova, são necessários outros experimentos para confirmar a diferença de atividade de CD99 em função de sua localização.

A fim de se corroborar os achados de expressão gênica, proteica e imunolocalização obtidos com as amostras de astrocitomas de diferentes graus, neste trabalho foi realizado um modelo de estudo *in vitro* utilizando três linhagens celulares de GBM com comportamentos biológicos e padrão de expressão de CD99 distintos. A imunolocalização de CD99 nas linhagens celulares U87MG e A172 foi semelhante aos dados observados nas amostras de GBM, com a proteína apresentando acentuada expressão na região de membrana plasmática. Entretanto, a linhagem celular T98G apresentou marcação muito fraca quando comparada às linhagens U87MG e A172, com poucas células apresentando marcação no citoplasma e excessiva marcação de CD99 na membrana citoplasmática. A avaliação da capacidade de migração das linhagens celulares revelou que ambas U87MG e A172 possuíam maior

capacidade de migração em relação a T98, embora as células U87MG fossem às células de maior capacidade migratória. A localização por imunofluorescência de CD99 nas células U87MG foi coincidente com a região membranar principalmente nas estruturas denominadas lamelipódios que são fundamentais para que células neoplásicas com potencial invasivo possam expressar este fenótipo. Considerando o potencial migratório das linhagens celulares U87MG e A172, assim como o padrão de marcação da proteína CD99 semelhante ao observado nas amostras de GBM, com acentuada expressão na região de membrana plasmática, ambas as linhagens celulares foram selecionadas para os experimentos *in vitro* de silenciamento da expressão gênica de *CD99*.

A expressão de CD99 em região de contato célula-célula tem sido bem caracterizada em componentes do sistema imune que participam no processo de diapedese, mostrando um papel fundamental de CD99 nos eventos que propiciam adesão e transmigração epitelial (Bixel *et al.*, 2010; Imbert *et al.*, 2006).

Os resultados do presente trabalho referentes ao potencial migratório das linhagens celulares U87MG e A172 mostraram que o silenciamento de *CD99* inibiu a capacidade migratória destas linhagens indicando uma redução em seu potencial invasivo e, consequentemente, caráter maligno. Em contrapartida, as células A172 que já apresentavam menor capacidade migratória, quando silenciadas para *CD99*, praticamente não migraram. A linhagem celular A172, quando transfectada com siRNA para *CD99*, apresentou alterações morfológicas intensas, com grandes quantidades de células perdendo adesão e, consequentemente, morrendo e com as restantes que permaneceram em monocamada apresentando morfologia circular muito distinta do que é esperado para a linhagem (dado não apresentado). Células malignas necessitam de uma quantidade mínima de matriz para proliferarem e invadirem, uma vez que matrizes densas dificultariam sua habilidade invasiva, enquanto que a ausência de contato com a matriz inibiria seu crescimento e migração podendo até desencadear a morte. Desta maneira, um estado intermediário de adesão, com reorganização das fibras de estresse e das adesões focais que medeiam adesões fortes, é o ideal para a invasão cancerosa, já que as células ainda que envoltas por densa matriz encontram-se ancoradas pontualmente ao substrato, garantindo que não ocorra perda de adesão com consequente morte por *anoikis*. Assim, as células apresentam-se mais aptas a

proliferar e migrar. Os dados apresentados para as diferentes linhagens, embora aparentemente contraditórios, podem indicar um papel funcional distinto de CD99 em cada uma das linhagens. Em nossa hipótese, células U87MG necessitariam da expressão de CD99 de maneira pontual na região de lamelipódios, garantindo um estado de adesão intermediário e, conseqüentemente, esboçando seu caráter invasivo. Uma vez abolida a expressão desta proteína, as células perdem sua capacidade migratória, apresentando um estado de adesão forte e necessário à sobrevivência celular, mas que inviabiliza seu fenótipo mais agressivo. Essa hipótese foi reforçada com as análises de imunofluorescência em larga escala que mostraram um aumento do volume celular com elevada intensidade de marcação do citoesqueleto nas células com expressão inibida de *CD99*, indicando uma reorganização das fibras e estruturas de adesão. Em contrapartida, as células A172 mostraram-se muito mais dependentes da expressão de CD99, uma vez que, quando silenciada a expressão da proteína, grande parte das células morreram e as restantes esboçaram uma morfologia coincidente com aquela desencadeada pelo processo de morte por perda de adesão (Taddei *et al.*, 2012). Possivelmente nesta linhagem CD99 desempenha um papel estrutural fundamental para a regulação e organização do citoesqueleto celular, inviabilizando a sobrevivência da célula em sua ausência. Considerando que a linhagem A172 tem um caráter menos agressivo, essa hipótese pode ser relevante, pois as características adaptativas de uma célula menos maligna são menores em comparação àquelas de fenótipo mais agressivo. Recentemente, Seol e colaboradores demonstraram que a expressão e ativação da isoforma selvagem de CD99 aumenta a capacidade invasiva e migratória de linhagens celulares de GBMs. No modelo proposto a proteína CD99 teria importante participação na alteração do modo migratório amebóide, com ativação da proteína Rho, via proteína Rac, durante o processo de migração das células tumorais, indicando que CD99 pode ser um futuro alvo importante para inibir a migração e invasão, especialmente em gliomas que expressam esta proteína (Seol *et al.*, 2012).

O conjunto dos dados indica que, embora a biologia e comportamento das células A172 e U87MG sejam distintos, os efeitos do silenciamento de *CD99* afetam principalmente processos relacionados à adesão celular, com efeitos na capacidade migratória, proliferação e sobrevivência. A participação efetiva de CD99 na regulação de moléculas de adesão como

ICAM-1, PCAM-1, LFA-1 (integrina $\alpha_1\beta_2$) tem sido amplamente discutida tanto em processos fisiológicos normais como no câncer (Hahn *et al.*, 1997; Bernard *et al.*, 2000; Kasinrerker *et al.*, 2000; Schenkel *et al.*, 2002; Yun *et al.*, 2006; Khunkaewla *et al.*, 2007; Lou *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2009; Pata *et al.*, 2011; Torzicky *et al.*, 2012), além da relação direta entre estimulação de CD99 com repolimerização da actina via recrutamento de moléculas como GTPases Rho, Rac, que são cruciais para a remodelação do citoesqueleto celular (Alberti *et al.*, 2002; Brunton *et al.*, 2004; Cerisano *et al.*, 2004). Os resultados apresentados indicam que elementos do citoesqueleto possam ser as moléculas-chave para a transdução do sinal mediado por CD99 nas linhagens de GBM estudadas.

Scotlandi e colaboradores (2006) demonstraram *in vivo* eficácia pré-clínica do tratamento combinado anti-CD99 (MAb) e doxorrubicina em Sarcoma de Ewing (Scotlandi *et al.*, 2006). Os resultados deste trabalho corroboram a utilização de CD99 como uma modalidade de intervenção terapêutica combinada aos agentes quimioterápicos conhecidos. Portanto, os resultados obtidos até o momento neste trabalho são de grande relevância, pois uma vez que confirmada a participação de CD99 na habilidade invasiva das células de GBM, o mesmo poderá ser estudado com um enfoque terapêutico.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. *CD99* foi selecionado *in silico* com expressão aumentada em placenta e astrocitomas.
2. Astrocitomas de diferentes graus de malignidade apresentam expressão gênica e proteica de *CD99* elevada em comparação ao tecido não neoplásico, com os GBMs apresentando os maiores valores de entre os astrocitomas difusamente infiltrativos.
3. A proteína *CD99* está localizada na membrana celular dos astrocitomas mais malignos AGIII e AGIV, e no núcleo e citoplasma dos astrocitomas de menor grau de malignidade (AGI e AGII).
4. *CD99* está expresso nas linhagens de GBM U87MG, A172 e T98G com maior localização na membrana celular na célula U87MG que possui maior capacidade de migração *in vitro*.
5. O silenciamento de *CD99* nas linhagens celulares de GBM levou a uma diminuição da migração e proliferação, indicando uma redução no fenótipo maligno das linhagens celulares estudadas.
6. As células U87MG silenciadas para *CD99* apresentaram alterações morfológicas condizentes com reorganização do citoesqueleto, corroborando a hipótese do envolvimento de *CD99* como um modulador do processo de migração celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson DC, Rasheed BA, McLendon RE, Bigner DD. Central nervous system. *Cancer Biomark*. 2010;9:193-210.

Alberti I, Bernard G, Rouquette-Jazdanian AK, Pelassy C, Pourtein M, Aussel C, Bernard A. CD99 isoforms expression dictates T cell functional outcomes. *FASEB J*. 2002;16:1946–1948.

Ali A, Serra S, Asa SL, Chetty R. The predictive value of CK19 and CD99 in pancreatic endocrine tumors. *Am J Surg Pathol*. 2006 Dec;30(12):1588-94.

Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer*. 1991;67:1886-93.

Aubrit F, Gelin C, Pham D, Raynal B, Bernard A. The biochemical characterization of E2, a T cell surface molecule involved in rosettes. *Eur J Immunol*. 1989; 19:1431.

Bernard G, Raimondi V, Alberti I, Pourtein M, Widjenes J, Ticchioni M, Bernard A. CD99 (E2) up-regulates alpha-4beta1-dependent T cell adhesion to inflamed vascular endothelium under flow conditions. *Eur J Immunol*. 2000;30:3061–3065.

Bixel MG, Li H, Petri B, Khandoga AG, Khandoga A, Zarbock A, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Sorokin L, Zeuschner D, Maerz S, Butz S, Krombach F, Vestweber D. CD99 and CD99L2 act at the same site as, but independently of, PECAM-1 during leukocyte diapedesis. *Blood*. 2010;116:1172-1184.

Brower JV, Clark PA, Lyon W, Kuo JS. MicroRNAs in cancer: Glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells. *Neurochem Int*. 2014;77C:68-77.

Brown RE, Boyle JL. Mesenchymal chondrosarcoma: molecular characterization by a proteomic approach, with morphogenic and therapeutic implications. *Ann Clin Lab Sci*. 2003;33:131–141.

Brunton, VG, MacPherson, IRJ, Frame, MC. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1692:121–144.

Buxton D, Bacchi CE, Gualco G, Weiss LM, Zuppan CW, Rowsell EH, Huang Q, Wang J. Frequent expression of CD99 in anaplastic large cell lymphoma: a

clinicopathologic and immunohistochemical study of 160 cases. *Am J Clin Pathol*. 2009;131:574–579.

Byun HJ, Hong IK, Kim E, Jin YJ, Jeoung DI, Hahn JH, Kim YM, Park SH, Lee H. A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways. *J Biol Chem*. 2006;281:34833–34847.

Camara-Quintana JQ, Nitta RT, Li G. Pathology: commonly monitored glioblastoma markers: EGFR, EGFRvIII, PTEN, and MGMT. *Neurosurg Clin N Am*. 2012;23:237–246.

Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455:1061–1068.

Cerisano V, Aalto Y, Perdichizzi S, Bernard G, Manara MC, Benini S, Cenacchi G, Preda P, Lattanzi G, Nagy B, Knuutila S, Colombo MP, et al. Molecular mechanisms of CD99-induced caspase-independent cell death and cell-cell adhesion in Ewing's sarcoma cells: actin and zyxin as key intracellular mediators. *Oncogene*. 2004;23:5664–5674.

Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Bäsecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell*. 2012;3149:36–47.

Choi YL, Kim HS, Ahn G. Immunoexpression of inhibin α subunit, inhibin/activin β A subunit and CD99 in ovarian tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124:563–569.

Choi YL, Xuan YH, Shin YK, Chae SW, Kook MC, Sung RH, Youn SJ, Choi JW, Kim SH. An immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in gallbladder lesions. *J Histochem Cytochem*. 2004;52:591–601.

Conzo G, Tartaglia E, Gambardella C, Mauriello C, Esposito D, Mascolo M, Russo D, Stornaiuolo G, Gaeta GB, Santini L. Suprarenal solitary fibrous tumor associated with a NF1 gene mutation mimicking a kidney neoplasm: implications for surgical management. *World J Surg Oncol*. 2014;12:87.

Darefsky AS, King JT Jr, Dubrow R. Adult glioblastoma multiforme survival in the temozolomide era: A population-based analysis of surveillance, epidemiology, and end results registries. *Cancer*. 2011;118:2163–2172.

De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16 Suppl 2:S17–27.

Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, Agarwalla PK, Chheda MG, Campos B, Wang A, Brennan C, Ligon KL, Furnari F, Cavenee WK, Depinho RA, Chin L, Hahn WC. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev.* 2012;15;26:756-784.

Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, Printz D, Fröschl G, Buchinger P, Mann G, Gadner H. CD99 (MIC2) expression in paediatric B-lineage leukaemia/lymphoma reflects maturation-associated patterns of normal B-lymphopoiesis. *Br J Haematol.* 1999;105(3):690-5.

Edlund K, Lindskog C, Saito A, Berglund A, Pontén F, Göransson-Kultima H, Isaksson A, Jirstrom K, Planck M, Johansson L, Lambe M, Holmberg L, Nyberg F, Ekman S, Bergqvist M, Landelius P, Lamberg K, Botling J, Ostman A, Micke P. CD99 is a novel prognostic stromal marker in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2012;131:2264-273.

Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer.* 2011;2:344-358.

Ferreti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update.* 2007;13:121–141

Fleming AJ, Chi SN. Brain tumors in children. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2012; 42:80-103.

Freshney RI; Alan R. Culture of animal cells: a manual of basic technique. *New York: Wiley-liss*, 1987.

Gelin C, Aubrit F, Phalipon A, Raynal B, Cole S, Kaczorek M, Bernard A. The E2 antigen, a 32 kda glycoprotein involved in T-cell adhesion processes, is the MIC2 gene product. *EMBO J.* 1989;8:3253-3259.

Goodfellow PJ, Mondello C, Darling SM. Absence of methylation of a CpG-rich region at the 5' end of the MIC2 gene on the active X, the inactive X, and the Y chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:5605-5609.

Goto A, Niki T, Terado Y, Fukushima J, Fukayama M. Prevalence of CD99 protein expression in pancreatic endocrine tumours (PETs). *Histopathology.* 2004;45:384-392.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-674.

Hahn JH, Kim MK, Choi EY, Kim SH, Sohn HW, Ham DI, Chung DH, Kim TJ, Lee WJ, Park CK, Ree HJ, Park SH. CD99 (MIC2) regulates the LFA-1/ICAM-1-mediated adhesion of lymphocytes, and its gene encodes both positive and negative regulators of cellular adhesion. *J Immunol.* 1997;159:2250-2258.

Hartel PH, Fanburg-Smith JC, Frazier AA, Galvin JR, Lichy JH, Shilo K, Franks TJ. Primary pulmonary and mediastinal synovial sarcoma: a clinicopathologic study of 60 cases and comparison with five prior series. *Mod Pathol*. 2007;20:760-769.

He Y, Zhang C, Liu G, Tian Z, Wang L, Kalfarentzos E. Giant cell angiofibroma misdiagnosed as a vascular malformation and treated with absolute alcohol for one year: a case report and review of the literature. *World J Surg Oncol*. 2014;12:117.

Höland K, Salm F, Arcaro A. The phosphoinositide 3-kinase signaling pathway as a therapeutic target in grade IV brain tumors. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11:894-918.

Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin Proc*. 2009;84:985–1000.

Huang X, Zhou X, Wang Z, Li F, Liu F, Zhong L, Li X, Han X, Wu Z, Chen S, Zhao T. CD99 triggers upregulation of miR-9-modulated PRDM1/BLIMP1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells and induces redifferentiation. *Int J Cancer*. 2012; 131:E382-94.

Huttner A. Overview of primary brain tumors: pathologic classification, epidemiology, molecular biology, and prognostic markers. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012;26:715-732.

Imbert AM, Belaaloui G, Bardin F, Tonnelle C, Lopez M, Chabannon C. CD99 expressed on human mobilized peripheral blood CD34+ cells is involved in transendothelial migration. *Blood*. 2006;15;108:2578-2586.

Johnson KJ, Fisher MJ, Listernick RL, North KN, Schorry EK, Viskochil D, Weinstein M, Rubin JB, Gutmann DH. Parent-of-origin in individuals with familial neurofibromatosis type 1 and optic pathway gliomas. *Fam Cancer*. 2012;11:653-656.

Jongeneel CV, Delorenzi M, Iseli C, Zhou D, Haudenschild CD, Khrebtkova I, Kuznetsov D, Stevenson BJ, Strausberg RL, Simpson AJ, Vasicek TJ. An atlas of human gene expression from massively parallel signature sequencing (MPSS). *Genome Res*. 2005;15:1007–1014.

Kasinrerk W, Tokrasinwit N, Moonsom S, Stockinger H. CD99 monoclonal antibody induce homotypic adhesion of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathway. *Immunol Lett*. 2000;71:33-41.

Khunkaewla P, Chiampanichayakul S, Yasamut U, Pata S, Kasinrerk W. Production, characterization, and functional analysis of newly established CD99 monoclonal antibodies MT99/1 and MT99/2. *Hybridoma (Larchmt)*. 2007, 26:241-250.

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61:215-225.

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(1):154-9.

Kommoss F, Oliva E, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Amin MB, Bhan AK, Young RH, Scully RE. Inhibin-alpha CD99, HEA125, PLAP, and chromogranin immunoreactivity in testicular neoplasms and the androgen insensitivity syndrome. *Hum Pathol.* 2000;31:1055-1061.

Laje P, Bhatti TR, Adzick NS. Solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas in children: a 15-year experience and the identification of a unique immunohistochemical marker. *J Pediatr Surg.* 2013;48:2054-2060.

Lee JH, Kim SH, Wang LH, Choi YL, Kim YC, Kim JH, Park TS, Hong YC, Shin YK. Clinical significance of CD99 downregulation in gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2584–2591.

Lee MK, Kim HS, Kim SS, Cho MH, Lee IS. Analysis of the dimerization of human CD99 using bimolecular fluorescence complementation technique. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18:472-476.

Levy R, Dilley J, Fox RI, Warnke R. A human thymus-leukemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76:6552–6556.

Lin YZ, Wei Y, Xu N, Li XD, Xue XY, Zheng QS, Jiang T, Huang JB. Thyroid-like follicular carcinoma of the kidney: A report of two cases and literature review. *Oncol Lett.* 2014;7(6):1796-1802.

Lino MM, Merlo A. PI3Kinase signaling in glioblastoma. *Neurooncol.* 2011;103:417-427.

Liu F, Zhang Y, Tang H, Zhou X, Wu Z, Tang D, Zhao T. CXC chemokine ligand 16, inversely correlated with CD99 expression in Hodgkin Reed-Sternberg cells, is widely expressed in diverse types of lymphomas. *Oncol Rep.* 2013;30:783-792.

Liu Z, Li J, Liu Z, Wang Q, Famer P, Mehta A, Chalif D, Wang Y, Li JY. Supratentorial cortical ependymoma: case series and review of the literature. *Neuropathology.* 2014; 34(3):243-52.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-CT Method. *Elsevier Science*. 2001;25:402-408.

Lou O, Alcaide P, Luscinskas FW, Muller WA: CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *J Immunol*. 2007;178:1136-1143.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. Lyon, IARC; 2007a.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007b;2:97-109.

Magro G, Righi A, Caltabiano R, Casorzo L, Michal M. Vulvovaginal angioyofibroblastomas: morphologic, immunohistochemical, and fluorescence in situ hybridization analysis for deletion of 13q14 region. *Hum Pathol*. 2014;45(8):1647-55.

Mahfouz S, Aziz AA, Gabal SM, el-Sheikh S. Immunohistochemical study of CD99 and EMA expression in ependymomas. *Medscape J Med*. 2008;19;10(2):41.

Maitra A, Hansel DE, Argani P, Ashfaq R, Rahman A, Naji A, Deng S, Geradts J, Hawthorne L, House MG, Yeo CJ. Global expression analysis of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms using oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5988-5995.

Manara MC, Bernard G, Lollini PL, Nanni P, Zuntini M, Landuzzi L, Benini S, Lattanzi G, Sciandra M, Serra M, Colombo MP, Bernard A, Picci P, Scotlandi K. CD99 acts as an oncosuppressor in osteosarcoma. *Mol Biol Cell*. 2006;17:1910–1921.

Marie SKN, Okamoto OK, Uno M, Hasegawa APG, Oba-Shinjo SM, Cohen T, *et al*. Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int. J. Cancer* 2008;122:807–815.

McDowell KA, Riggins GJ, Gallia GL. Targeting the AKT pathway in glioblastoma. *Curr Pharm Des*. 2011;17:2411-2420.

Milanezi F, Pereira EM, Ferreira FV, Leitão D, Schmitt FC. CD99/MIC-2 surface protein expression in breast carcinomas. *Histopathology*. 2001;39:578-583.

Moricoli D, Muller WA, Carbonella DC, Balducci MC, Dominici S, Watson R, Fiori V, Weber E, Cianfriglia M, Scotlandi K, Magnani M. Blocking monocyte transmigration in in vitro system by a human antibody scFv anti-CD99. Efficient large scale purification from periplasmic inclusion bodies in *E. coli* expression system. *J Immunol Methods*. 2014;408:35-45.

Nakada M, Kita D, Teng L, Pyko IV, Watanabe T, Hayashi Y, Hamada J. Receptor tyrosine kinases: principles and functions in glioma invasion. *Adv Exp Med Biol.* 2013;986:143-170.

Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita T, Yamashita J, Yamamoto H. Placenta Growth Factor (PIGF) mRNA expression in brain tumors. *J Neurooncol.* 1998;10:123-130

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170:1445-1453.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* 2009;100:2235-2241.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2011;28:177-183.

O'Neill AF, Dearling JL, Wang Y, Tupper T, Sun Y, Aster JC, Calicchio ML, Perez-Atayde AR, Packard AB, Kung AL. Targeted imaging of Ewing sarcoma in preclinical models using a ⁶⁴Cu-labeled anti-CD99 antibody. *Clin Cancer Res.* 2014;20(3):678-87.

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2014;16:896-913.

Ozog MA, Bechberger JF, Naus CC. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) in combination with its soluble receptor (CNTFRalpha) increases connexin43 expression and suppresses growth of C6 glioma cells. *Cancer Res.* 2002;62:3544-3548.

Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3481-98.

Park JY, Kim SG, Park J. Solid pseudopapillary tumor of the pancreas in children: 15-year experience at a single institution with assays using an immunohistochemical panel. *Ann Surg Treat Res.* 2014;86:130-5.

Pata S, Otáhal P, Brdička T, Laopajon W, Mahasongkram K, Kasinrerk W. Association of CD99 short and long forms with MHC class I, MHC class II and tetraspanin CD81 and recruitment into immunological synapses. *BMC Res Notes.* 2011;4:293.

Persano L, Rampazzo E, Basso G, Viola G. Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem Pharmacol.* 2013;85:612-622.

Petit C, Levilliers J, Weissenbach J. Physical mapping of the human pseudoautosomal region; comparison with genetic linkage map. *EMBO J*. 1988;7:2369-2376.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9:157-173.

Ramani P, Rampling D, Link M. Immunocytochemical study of 12E7 in small round-cell tumours of childhood: an assessment of its sensitivity and specificity. *Histopathology*. 1993;23:557-561.

Ramon AL, Bertrand JR, de Martimprey H, Bernard G, Ponchel G, Malvy C, Vauthier C. siRNA associated with immunonanoparticles directed against cd99 antigen improves gene expression inhibition in vivo in Ewing's sarcoma. *J Mol Recognit*. 2013;26(7):318-29.

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

Ricard D, Idbaih A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. *Lancet*. 2012;379:1984-96.

Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, Garofalo C, Meschini S, Astolfi A, Colombo MP, Lessnick SL, Picci P, et al. CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest*. 2010;120:668-80.

Rosenkranz, A.R., Majdic, O., Stockl, J., Pickl, W., Stockinger, H. and Knapp, W. Induction of neutrophil homotypic adhesion via sialophorin (CD43). a surface sialoglycoprotein restricted to haemopoietic cells. *Immunology*. 1993;80,431-438.

Sayers TJ. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60:1173-1180.

Schneider MK, Ghielmetti M, Rhyner DM, Antsiferova MA, Seebach JD. Human leukocyte transmigration across Gal α (1,3)Gal-negative porcine endothelium is regulated by human CD18 and CD99. *Transplantation*. 2009;87:491-499.

Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol*. 2002;3:143-150.

Sciandra M, Marino MT, Manara MC, Guerzoni C, Grano M, Oranger A, Lucarelli E, Lollini PL, Dozza B, Pratelli L, Renzo MF, Colombo MP, Picci P, Scotlandi K. CD99 drives terminal differentiation of osteosarcoma cells by acting as a spatial regulator of ERK 1/2. *J Bone Miner Res.* 2014;29:1295-1309.

Scotlandi K, Perdichizzi S, Bernard G, Nicoletti G, Nanni P, Lollini PL, Curti A, Manara MC, Benini S, Bernard A, Picci P. Targeting CD99 in association with doxorubicin: an effective combined treatment for Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer.* 2006;42(1):91-6.

Scotlandi K, Zuntini M, Manara MC, Sciandra M, Rocchi A, Benini S, Nicoletti G, Bernard G, Nanni P, Lollini PL, Bernard A, Picci P. CD99 isoforms dictate opposite functions in tumour malignancy and metastases by activating or repressing c-Src kinase activity. *Oncogene.* 2007;26:66046618.

Smith MJ, Goodfellow PJ, Goodfellow PN. The genomic organisation of the human pseudoautosomal gene MIC2 and the detection of a related locus. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2:417-422.

Soundararajan R, Rao AJ. Trophoblast 'pseudo-tumorigenesis': significance and contributory factors. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;2:15.

Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol.* 2012;226(2):380-393.

Terada T. TDT (-), KIT (+), CD34 (+), CD99 (+) precursor T lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5:167-170.

Terada T. Primary cutaneous neuroendocrine tumor (atypical carcinoid) expressing KIT and PDGFRA with myoepithelial differentiation: a case report with immunohistochemical and molecular genetic studies. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(4):802-9.

Torzicky M, Viznerova P, Richter S, Strobl H, Scheinecker C, Foedinger D, Riedl E. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and CD99 are critical in lymphatic transmigration of human dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2012;132:1149-1157.

Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Scrideli CA, Paço-Larson ML, Carlotti CG Jr. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol.* 2009;3;10:17.

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;18;3(7):RESEARCH0034.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;19:17(1):98-110.

Wang J, Shiratori I, Satoh T, Lanier LL, Arase H. An essential role of sialylated O-linked sugar chains in the recognition of mouse CD99 by paired Ig-like type 2 receptor (PILR). *J Immunol*. 2008;180:1686-1693.

Wang J, Zhang X. Survivin promotes glioma angiogenesis through vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in vitro and in vivo. *Mol Carcinog*. 2012;51:586-595.

Westermarck B. Glioblastoma - a moving target. *Ups J Med Sci*. 2012;117:251-256.

Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int*. 2014;5:64.

Yoo SH, Han J, Kim TJ, Chung DH. Expression of CD99 in pleomorphic carcinomas of the lung. *J Korean Med Sci*. 2005;20:50-55.

Yun PL, Decarlo AA, Hunter N. Gingipains of *Porphyromonas gingivalis* modulate leukocyte adhesion molecule expression induced in human endothelial cells by ligation of CD99. *Infect Immun*. 2006;74:1661-1672.

Zhou Q, Xu J, Zhao J, Zhang S, Pan W. Downregulation of CD99 and upregulation of human leukocyte antigen class II promote tumor aggravation and poor survival in patients with osteosarcomas. *Onco Targets Ther*. 2014;7:477-484.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1: Aprovação do presente estudo pela CAPPesq.

8.2. Anexo 2: Exemplo do Termo de Consentimento Pós-Informado entregue aos pacientes incluídos no presente estudo.

8.3. Anexo 3 : Informações e dados clínicos dos pacientes incluídos no presente estudo.

8.3. Anexo 4 : Informações referentes as bibliotecas SAGE de córtex cerebral normal e astrocitomas utilizadas no presente estudo.

8.3. Anexo 5 : Artigo referente ao presente estudo publicado pela revista Journal of Neuro-Oncology.

ANEXO 1

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 ad referendum** em 21.10.14 a execução do subprojeto intitulado "**Estudo funcional de CD99 na tumorigênese de astrocitomas**", como tese de doutorado de **Úrsula Urias dos Santos**, sob orientação de **Sueli Mieko Oba Shinjo**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0995/06**, intitulado "**Estudo da expressão aberrante em tumores do sistema nervoso central de genes envolvidos em placenta**", aprovado por esta CAPPesq em 26.10.06.

Pesquisador responsável: Sueli Kazue Nagahashi Marie

CAPPesq, 21 de Outubro de 2014

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO 2

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

ANEXO 3

Diagnóstico	Caso	Número	AS3	Nome	Sexo	Idade*	Registro HC	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	7044114J	48-6856-3	08/05/70	28/06/01		7a 8m	
NN	2	132	N	EOA	M	51a	2775661A	49-5770-9	10/11/49	16/08/01		7a 4m	
NN	3	167	N	EA	M	39a	3288025F	50-4808-7	31/03/62	17/10/01		7a 4m	
NN	4	173	N	MIM	F	44a	3055143A	50-5645-4	04/10/57	24/10/01		7a 4m	
NN	5	179	N	ED	F	39a	7041451D		21/03/62	31/10/01		7a 4m	
NN	6	189	N	RLG	F	35a	3013021C		15/06/66	21/11/01		7a 3m	
NN	7	196	N	IG	F	44a	3170702G		15/08/57	05/12/01		7a 2m	
NN	8	226	N	PST	M	38a	2995897G	51-7832-0	25/06/63	31/01/02		7a 1m	
NN	9	232	N	FPB	M	28a	2920291E		08/10/73	14/02/02		7a 0m	
NN	10	237	N	AML	F	47a	7028040A	52-0316-3	08/09/54	20/02/02		7a 0m	
NN	11	245	N	GVA	M	25a	2859949E	52-1343-6	25/06/76	28/02/02		7a 0m	
NN	12	263	N	MML	M	27a	2835024G		10/12/74	04/04/02		6a 10m	
NN	13	312	N	MCL	F	41a	3189719A	53-6502-3	18/05/61	13/06/02		6a 8m	
NN	14	330	N	LMR	M	32a	2374932H	54-1685-0	14/02/70	23/07/02		6a 7m	
NN	15	332	N	MSM	F	32a	3359015D	54-2198-5	07/03/79	25/07/02		6a 7m	
NN	16	349	N	AGCC	M	40a	55301488G	54-2969-9	26/12/61	21/08/02		6a 6m	
NN	17	714	N	VLPM	F	56a	13622992A	62-2613-2	04/06/47	18/03/04		5a 10m	
NN	18	714	N	VLPM	F	56a	13602383F	62-2100-9	04/06/47	18/03/04		4a 11m	
NN	19	755	N	SVSB	F	39a	7048016C	63-0783-3	14/07/64	19/05/04		4a 9m	
NN	20	805	N	SAD	F	37a	7047635A	641342-0	14/10/66	04/08/04		4a 6m	
NN	21	861	N	RM	M	35a	13561850G	65-3324-8	01/04/69	03/11/04		4a 3m	
NN	22	969	N	GC	F	34a	7047021J		28/02/71	05/05/05		3a 9m	
AGI	23	185	N	APF	M	24a	13522266H	50-8257-9	11/10/77	12/11/01		7a 3m	
AGI	24	335	N	MI	F	34a	2568552A	54-2626-0	15/11/67	30/07/02		6a 7m	

AGI	25	352	N	JRS	M	35a	13578917K	54-6383-1	28/09/66	23/08/02		6a 6m	
AGI	26	363	N	RFCo	M	13a	6063214G	54-9952-6	20/04/89	18/09/02		6a 5m	
AGI	27	421	N	IAPV	F	16a	13473553G	56-4821-1	09/03/86	15/01/03		6a 5m	
AGI	28	436	N	WGG	M	18a	13570687I	56-8949-0	09/01/85	10/02/03		6a 0m	
AGI	29	463	N	SEM	F	16a	13449456G	57-3638-2	07/07/86	21/03/03		5a 11m	
AGI	30	495	N	ASJM	F	8a	13492358C	58-1515-0	16/10/94	21/05/03		5a 9m	
AGI	31	501	N	RJB	M	32a	13491797C	58-2590-3	18/03/71	28/05/03		5a 9m	
AGI	32	570	N	KBRP	F	8a	13594605C	59-5895-4	05/04/95	01/09/03		6a 1m	
AGI	33	594	N	JCFS	M	18a	3367062G	59-9510-8	13/06/85	24/09/03		5a 5m	
AGI	34	61	N	JJS	M	21a	1359908G	60-0984-0	26/07/82	06/10/03		5a 4m	
AGI	35	828	N	WHO	M	16a	77071554A	64-8111-6	21/06/88	23/09/04		4a 5m	
AGI	36	878	N	JBS	F	18a	13658238-D	65-6608-1	02/11/86	29/11/04		4a 3m	
AGI	37	889	N	WAD	F	43a	13661866-B	65-9211-2	27/05/61	17/12/04		4a 2m	
AGI	38	892	N	RAR	M	14a	13665259-F	65-9601-0	01/01/90	22/12/04		4a 2m	
AGI	39	932	N	JSO	M	17a	13672526-D	667407-0	13/04/87	07/03/05		3a 11m	
AGI	40	946	N	PRTS	M	9a	3206638-A	669467-5	06/11/95	23/03/05		3a 11m	
AGI	41	995	N	JTAN	M	22a	13685104-G	68-3465-7	14/01/83	02/07/05		3a 8m	
AGI	42	1000	N	DSS	M	4a	13694475-E	68-4796-0	10/09/00	13/07/05		3a 7m	
AGI	43	1044	N	LRR	M	8a	13610605-I	69-6825-2	28/10/96	05/10/05		3a 4m	
AGI	44	1049	N	AOS	F	14a	13708589-J	69-8645-5	18/09/91	19/10/05		3a 4m	
AGI	45	1058	N	RLS	M	22a	77077345-C	70-0849-0	07/02/83	04/11/05		3a 3m	
AGII	46	55	89	MAP	F	36a	2623330D	46-6343-8	21/03/64	02/01/01		8a 2m	114
AGII	47	76	14	ML	M	27a	3361902H	47-3260-0	04/12/73	23/03/01	04/12/05		56
AGII	48	101	10	JNO	F	23a	7047105H	48-3300-7	25/10/77	04/06/01		7a 8m	82
AGII	49	118	2	AMC	F	45a	13546582F	49-1687-5	02/08/55	23/07/01	30/07/03		24
AGII	50	239	40	JRA	M	56a	13548901E	52-0559-0	25/07/45	22/02/02		7a 0m	91
AGII	51	250	39	MBC	F	30a	13562412F	52-2827-1	25/08/71	11/03/02		6a 11m	7
AGII	52	254	38	MGSJ	F	24a	13572670I	52-3726-2	18/06/77	15/03/02		6a 11m	27

AGII	53	267	1	AMM	M	43a	13574538G	52-7365-0	13/09/58	01/04/02		6a 10m	96
AGII	54	328	15	CHR	M	39a	77063187A	54-0842-3	18/04/63	17/07/02		6a 7m	91
AGII	55	341	14	ML	M	28a	3361902H	54-4295-8	04/12/73	09/08/02	04/12/05		
AGII	56	346	16	RTP	M	23a	77062139H	54-5126-4	03/06/79	15/08/02		6a 6m	51
AGII	57	392	22	ARVA	F	38a	3233880E	55-7686-5	09/05/64	11/11/02		6a 3m	80
AGII	58	412	1	AMM	M	44a	13574538G	56-2912-8	13/09/58	20/12/02		6a 2m	
AGII	59	452	62	MRS	M	41a	77062882E	57-1922-4	15/11/61	10/03/03	06/08/08	5a 11m	84
AGII	60	453	60	JOJ	M	28a	3144835K	57-1958-5	23/12/74	11/03/03		5a 11m	44
AGII	61	467	63	MAM	F	41a	13484936E	57-4432-6	25/10/61	27/03/03	06/09/06		41
AGII	62	490	52	NNS	M	35a	13491090E	58-0272-5	20/06/67	13/05/03	01/08/06		38
AGII	63	577	78	RNN	F	35a	13592815B	59-6637-0	08/10/67	05/09/03		5a 5m	50
AGII	64	715	88	AOE	F	27a	13622992A	62-2613-2	26/10/76	22/03/04	10/01/05		9
AGII	65	806	93	ESM	M	39a	13643283-C	64-1370-6	08/02/65	05/08/04		4a 6m	44
AGII	66	999	115	JWMS	M	25a	13683439-B	68-4581-1	19/08/79	12/07/05		3a 7m	60
AGII	67	1016	119	ES	M	35a	77068029-G	68-7346-4	12/08/69	21/10/03		1a 11m	23
AGII	68	1095	127	JPS	M	32a	13722519-E	71-3078-3	08/12/73	10/02/06		3a 0m	110
AGII	69	1099	129	MGSA	F	32a	13723677-B	71-4215-3	06/03/73	17/02/06		4a 4m	52
AGII	70	1113	62	MRS	M	44a	77062882E	71-9661-0	15/11/61	27/03/06	06/08/08		
AGII	71	1155	140	JSA	F	25a	13743082-E	2006-1830	13/07/81	14/07/06			43
AGIII	72	28	6	GAB	M	54a	3003852-K	45-5543-0	06/09/82	20/11/00		8a 3m	99
AGIII	73	34	53	MGCI	M	18a	3324020-E	45-7850-3	06/09/82	20/11/00		8a 3m	115
AGIII	74	73	51	MCV	F	25a	7042702A	47-2162-4	08/04/76	16/03/01	19/03/07		77
AGIII	75	233	41	OAA	F	58a	13567029I	51-9554-3	12/07/43	15/02/02	16/03/03		13
AGIII	76	249	3	AC	M	32a	3259481K	52-2586-8	27/12/69	08/03/02	21/10/02		7
AGIII	77	338	11	LKH	F	37a	13580020H	54-3528-5	21/01/65	05/08/02	14/10/03		14
AGIII	78	347	17	WCS	M	15a	13579476I	54-5552-9	20/04/87	19/08/02		6a 3m	82
AGIII	79	360	18	ICVK	F	32a	77063981H	54-9361-7	04/07/70	13/09/02		6a 5m	90
AGIII	80	366	8	GPJ	M	37a	13452901C	55-0872-0	25/08/65	23/09/02		6a 5m	93

AGIII	81	410	67	AAS	M	30a	13472055H	56-2773-7	04/08/73	19/12/02		6a 2m	77
AGIII	82	428	92	FCRN	M	58a	13454723D	56-6174-9	04/10/80	24/01/03		6a 1m	74
AGIII	83	478	64	ASM	M	39a	77066277G	57-6718-0	12/11/66	11/04/03	12/01/05		21
AGIII	84	514	73	LFF	M	37a	13498164D	58-5446-6	10/11/65	16/06/03		5a 8m	24
AGIII	85	734	100	JRS	M	31a	3246130E	62-7221-5	14/07/72	27/04/04		4a 10m	1
AGIII	86	905	38	MGSJ	F	27a	13572670-I	66-1379-9	18/06/77	14/01/05		4a 1m	1
AGIII	87	981	N	VGCJ	M	21a	6045626-J	67-8719-3	08/02/84	01/06/05		3a 9m	
AGIII	88	1033	121	ANS	F	29a	77060584-C	69-3015-8	02/06/76	08/09/05		3a 5m	2
AGIII	89	1036	120	MDDT	F	46a	13702355-F	69-3029-8	19/07/59	10/09/05	12/12/05		3
GBM	90	35	12	MPS	M	53a	3324020-E	45-7850-3	25/11/47	20/11/00	15/09/04		45
GBM	91	74	50	UC	M	74a	7045824G	47-2426-7	25/10/26	19/03/01	29/08/02		17
GBM	92	175	49	MTC	F	56a	3316801G	50-6045-1	07/04/45	26/10/01	31/03/02		5
GBM	93	194	48	OB	M	71a	77060472A	51-0694-0	29/05/30	30/11/01	01/10/03		22
GBM	94	204	47	BL	F	70a	2837573G	51-3734-9	01/01/30	21/12/01	06/08/02		7
GBM	95	208	45	EFC	M	62a	2869282K	51-4351-9	09/08/39	04/01/02	24/07/02		6
GBM	96	256	7	CDS	M	41a	13572856A	52-4509-5	25/11/60	21/03/02	14/06/02		2
GBM	97	269	43	ELAD	F	65a	13574725E	52-7569-5	28/02/37	12/04/02	18/04/02		0
GBM	98	274	42	BCJ	F	47a	77062152I	52-8714-6	20/12/54	19/04/02	27/09/02		17
GBM	99	297	4	MCE	F	78a	13445637B	53-3674-0	14/06/23	23/05/02	02/05/03		11
GBM	100	317	32	MJO	F	71a	2357547B	53-7898-2	22/12/30	24/06/02	15/09/02		2
GBM	101	356	30	JS	M	74a	5163770G	54-7434-5	17/06/28	30/08/02	23/08/03		11
GBM	102	370	29	WAS	M	45a	13581612B	55-1404-5	12/07/57	27/09/02	04/11/03		13
GBM	103	384	13	CSS	M	45a	1356103K	55-5488-8	27/04/57	25/10/02	14/03/03		14
GBM	104	391	9	IPP	F	54a	13581546D	55-7112-0	16/03/48	07/11/02	06/12/03		12
GBM	105	397	20	MCS	F	58a	2995994F	55-8650-0	08/12/43	20/11/02	30/04/03		5
GBM	106	405	30	JS	M	74a	13581612B	16-1466-0	12/07/57	10/12/02	04/11/03		
GBM	107	427	25	AJS	F	51a	3200846K	56-5920-5	11/11/51	23/01/03	13/07/03		5
GBM	108	442	27	MSS	M	68a	13473990D	56-9206-7	12/05/34	17/02/03	18/06/03		4

GBM	109	450	54	CMT	F	61a	13481051K	57-1498-2	26/08/41	06/03/03	13/05/04		14
GBM	110	458	55	MAA	M	62a	13482791J	57-2532-1	23/04/42	16/03/03	15/07/03		3
GBM	111	485	57	ASS	M	67a	13489242I	57-8817-0	18/02/36	01/05/03	30/11/03		6
GBM	112	496	58	SASC	F	57a	3009732B	58-1738-2	30/10/45	22/05/03	25/01/04		8
GBM	113	498	61	GP	F	17a	3346247F	58-1946-6	06/02/86	23/05/03	15/10/03		4
GBM	114	503	72	JRF	M	63a	13470665B	58-3233-0	17/07/39	02/06/03	25/08/03		2
GBM	115	510	71	VRS	M	56a	3335161J	58-4289-8	11/10/46	10/06/03	28/05/05		23
GBM	116	522	69	MFC	M	48a	13498664F	58-6616-2	20/05/55	27/06/06	20/07/05		24
GBM	117	524	56	ZFR	F	59a	13499574B	58-6807-6	05/11/43	30/06/03	11/03/04		8
GBM	118	547	75	AA	M	71a	13590219J	59-1211-3	15/08/31	31/07/03	15/09/04		13
GBM	119	555	24A	ADM	M	57a	13592731D	59-3422-2	20/07/46	14/08/03	16/02/05		18
GBM	120	573	70	EM	M	50a	3337216F	59-6190-4	14/11/52	03/09/03	04/06/04		9
GBM	121	592	74	MRKMB	F	40a	13599910A	59-9328-8	01/10/62	24/09/03		5a 5m	
GBM	122	629	79	JLS	M	64a	13605568F	60-6149-4	25/06/38	11/11/03	15/01/05		14
GBM	123	632	77	VAP	F	41a	13607484I	60-6580-5	15/08/62	13/11/03	23/03/06		28
GBM	124	639	13	VFC	M	55a	13607484I	60-6580-5	15/08/62	13/11/03	28/01/04		2
GBM	125	640	85	LPS	F	58a	44104649F	50-7753-6	12/12/44	21/11/03	13/05/04		5
GBM	126	642	59	NDT	M	42a	13608382J	60-7749-8	14/04/62	21/11/03	04/05/05		17
GBM	127	663	82	AFP	M	66a	3011915I	61-2537-9	11/12/37	05/12/03	06/08/04		7
GBM	128	684	81	ADM	F	56a	13616873G	61-7187-7	15/12/47	12/02/04	18/05/04		1
GBM	129	687	84	LZ	M	45a	13619180I	61-7615-1	07/03/58	16/02/04	28/12/04		9
GBM	130	698	83	ERL	M	58a	13621334B	61-9020-0	25/09/45	27/02/04	15/12/04		7
GBM	131	724	68	ACF	F	62a	13625792E	62-4884-5	01/02/42	08/04/04		4a 10m	
GBM	132	743	80	JPP	M	52a	2173677-K	62-8701-8	09/06/52	06/05/04	16/07/04		2
GBM	133	750	86	NR	M	51a	13613008-D	62-9711-0	23/09/52	13/05/04	25/11/04		6
GBM	134	792	N	IS	M	35a	44106871-I	63-8599-0	21/12/69	16/07/04	14/01/05		5
GBM	135	795	N	JCN	M	28a	13640608-J	63-9408-6	15/06/76	22/08/04	18/07/05		11
GBM	136	852	97	AGCC	M	60a	13654470A	65-2002-2	19/08/44	22/10/04	05/12/05		13

GBM	137	854	90	GFS	M	46a	13655653B	65-2828-7	17/06/58	27/10/04		4a 4m	
GBM	138	875	94	IS	M	35a	44106871-I	65-5776-7	21/12/69	23/11/04	14/01/05		
GBM	139	879	103	AM	M	61a	3024155-H	65-7270-7	27/07/43	02/12/04	18/03/05		3
GBM	140	881	95	JBF	M	49a	13661416-K	65-7715-6	25/01/55	07/12/04	22/04/05		4
GBM	141	884	97	ILR	F	52a	13663130-B	65-8286-9	15/01/52	10/12/04	08/04/07		27
GBM	142	885	N	MCG	F	86a	2105118-C	65-8283-4	24/04/18	10/12/04	23/02/05		2
GBM	143	891	98	FD	M	57a	13664358-H	65-9493-0	25/10/47	21/12/04	28/01/06		7
GBM	144	901	102	GMS	M	16a	13665181-J	66-0382-3	07/11/88	05/01/05	12/03/05		2
GBM	145	903	117	GSS	M	55a	13666243-J	66-0989-9	08/02/45	11/01/05	29/11/06		22
GBM	146	925	105	PMO	M	40a	13672566-C	66-5405-5	08/09/64	25/02/05	22/03/06		12
GBM	147	930	104	ASA	M	26a	13572505-G	66-6758-9	01/10/78	03/03/05	10/10/07		31
GBM	148	1002	108	MMC	M	40a	13693256-A	68-5149-5	29/01/65	15/07/05	04/10/05		2
GBM	149	1003	109	DGS	F	68a	13694933-J	68-5148-7	25/03/37	17/07/05	30/11/05		4
GBM	150	1007	117	MGSJ	F	28a	13572670-I	68-6084-2	18/06/77	22/07/05	18/11/05		3
GBM	151	1009	112	MAPL	F	38a	13680596-I	68-6226-8	25/10/66	25/07/05	12/03/05		21
GBM	152	1070	N	MR	M	72a	77077431-F	70-3955-7	09/03/33	29/11/05	05/08/06		8
GBM	153	1074	118	ILO	M	32a	137144223-E	70-4471-2	25/07/73	03/12/05		3a 11m	
GBM	154	1077	111	VAP	F	41a	13607484-I	70-6006-8	15/08/62	14/12/05	23/03/06		
GBM	155	1084	122	AJ	M	54a	13718609-B	70-9092-7	18/04/51	13/01/05	07/07/06		5
GBM	156	1091	124	WJGS	M	55a	13625572-H	71-1551-2	05/09/49	03/02/06	09/01/07		21
GBM	157	1103	137	AJ	M	54a	13718609-B	71-5874-2	18/04/51	03/03/06	07/07/06		
GBM	158	1118	130	APS	F	61a	13731814-H	72-2757-4	10/07/59	18/04/06	21/06/06		2
GBM	159	1122	123	AF	M	68a	55441508-G	72-4276-0	26/07/37	01/05/06	01/10/06		5
GBM	160	1123	131	EFS	M	53a	13732747-F	72-4527-0	29/10/53	02/05/06	21/04/07		11
GBM	161	1124	134	AE	M	63a	13732923-H	72-5103-3	19/03/43	05/05/06	20/09/06		4
GBM	162	1133	135	FCC	M	52a	55302090-A	72-8168-4	28/12/53	26/05/06	26/02/07		9
GBM	163	1144	133	SRS	M	76a	13740714-K	73-1961-4	15/08/29	25/06/06	07/09/06		2
GBM	164	1161	136	GFS	M	39a	13743659-F	2006-3702	13/01/67	26/07/06	08/11/07		13

ANEXO 4

Bibliotecas SAGE de córtex cerebral normal e astrocitomas de diferentes graus de malignidade (graus II, III e IV):

Cortex Normal:

- SAGE_Brain_normal_peds_cortex_B_H1571
- SAGE_Brain_normal_cortex_B_pool6
- SAGE_Brain_normal_cortex_B_BB542
- SAGE_Brain_astrocyte_normal_CL_NHA5

Astrocitoma Grau II:

- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H127
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H518
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H501
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H359
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H388
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H516
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_II_B_H530

Astrocitoma Grau III:

- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H1020
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H1055
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_R140

- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H272
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_407
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_343
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_R927
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_828
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_H970
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_584
- SAGE_Brain_astrocytoma_grade_III_B_439

Glioblastoma:

- SAGE_Brain_glioblastoma_B_R70
- SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1353
- SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1371
- SAGE_Brain_glioblastoma_B_R336
- SAGE_Brain_glioblastoma_B_pooled
- SAGE_Brain_glioblastoma_B_R20
- SAGE_Brain_glioblastoma_B_H833
- SAGE_Brain_glioblastoma_B_GBM1062
- SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1425C
- SAGE_Brain_glioblastoma_B_H1110

CD99 is upregulated in placenta and astrocytomas with a differential subcellular distribution according to the malignancy stage

Úrsula Urias · Suely K. N. Marie · Miyuki Uno · Roseli da Silva ·
Mariá M. Evagelinellis · Otavia L. Caballero · Brian J. Stevenson ·
Wilson A. Silva Jr. · Andrew J. Simpson · Sueli M. Oba-Shinjo

Received: 14 November 2013 / Accepted: 23 April 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract In the present study, we searched for genes highly expressed in placenta and that could contribute to the establishment and maintenance of a malignant phenotype in different types of tumours, and in astrocytomas in particular. We employed a strategy based on the integration of *in silico* data from previously generated massively parallel signature sequencing and public serial analysis of gene expression databases. Among 12 selected genes, *CD99* exhibited the highest relative mRNA expression in GBM compared to non-neoplastic brain tissues. In a larger cohort of astrocytic tumours, we further demonstrated increased *CD99* expression in all malignant grades, with GBMs showing the highest values. These findings were confirmed at the protein level by Western blotting and immunohistochemistry. Additionally, we demonstrated the

CD99 localisation profile in astrocytic tumours. Interestingly, *CD99* expression was confined to the cytoplasm or membrane in more malignant astrocytomas, in contrast to non-neoplastic brain tissue or non-infiltrative pilocytic astrocytoma, which showed no obvious staining in these structures. Comparison of three GBM cell lines revealed higher *CD99* expression at the membrane and higher migratory capacity in the A172 and U87MG lines, but lower *CD99* expression and no migratory ability in the T98 line. Knocking down *CD99* expression by siRNA decreased significantly the migration of both cell lines. These integrated *CD99* gene and protein expression results suggest that *CD99* expression in astrocytomas of different malignant grades might contribute to the infiltrative ability and support the importance of *CD99* as a potential target to reduce infiltrative astrocytoma capacity in migration and invasion.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11060-014-1462-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Ú. Urias · S. K. N. Marie · M. Uno · R. da Silva ·
M. M. Evagelinellis · S. M. Oba-Shinjo (✉)
Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Department of
Neurology, Faculdade de Medicina da, Universidade de São
Paulo, São Paulo, SP 01246-903, Brazil
e-mail: suelimoba@usp.br

S. K. N. Marie
Center for Studies of Cellular and Molecular Therapy
(NETCEM), University of São Paulo, São Paulo, Brazil

O. L. Caballero
Ludwig Institute for Cancer Research, New York Branch at
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York,
NY 10065, USA

B. J. Stevenson
Ludwig Institute for Cancer Research, University of Lausanne,
1015 Lausanne, Switzerland

W. A. Silva Jr.
Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School,
University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

W. A. Silva Jr.
Center for Integrative Systems Biology (CISBi-NAP),
University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

A. J. Simpson
Ludwig Institute for Cancer Research, 666 Third Avenue,
New York, NY 10017, USA

Keywords Astrocytic tumours · CD99 · Migration · Placenta

Introduction

Astrocytomas are the most common type of primary neuroepithelial brain tumour and show great heterogeneity [1]. According to World Health Organization (WHO) criteria, astrocytomas can be histologically separated into grades I through IV [2]. Pilocytic astrocytomas (grade I) are circumscribed, slow growing tumours with a good prognosis and mainly occur in children or young adults. Low-grade astrocytomas (grade II) show hypercellularity, relatively slow growth, and a propensity to invade surrounding normal brain tissue. Anaplastic astrocytomas (grade III) have increased cellularity, nuclear atypia, and mitotic figures. Glioblastomas, also known as GBMs (grade IV), are the most common malignant and aggressive of all brain malignancies, exhibiting anaplastic, highly proliferative cells, with frequent neoangiogenesis and necrosis [3–5]. The hallmark of GBM is its aggressive growth, with a highly invasive behaviour characterised by dramatically diffuse infiltration into the adjacent normal brain parenchyma. The overall median survival time is as short as 15 months, as GBM cells can escape complete resectability and are relatively resistant to the available therapies (radiation and chemotherapy) [6].

Similar to other cancer types, GBM demonstrates behaviours that are analogous to trophoblastic cells, suggesting shared pathways to control tumourigenic processes and placental implantation. In both cases, the establishment of an invasive phenotype comprises cellular processes that include increased proliferation, the expression or repression of specific cell adhesion molecules, the production of enzymes that digest the extracellular matrix, the expression of proto-oncogene products, telomerase activation, evasion or edition of the host immune response, and angiogenesis. Nevertheless, because of the strictly controlled signalling mechanisms that exist between maternal and embryonic cells, uncontrolled spread and immunologic rejection are avoided in placental tissue [7].

Based on the shared characteristics of tumour cells and trophoblasts, we searched *in silico* for genes that are specifically expressed in both placenta and tumour tissues using the MPSS and SAGE databases. We also used microarray expression from previously published data [8, 9] to filter our gene list. Among the genes selected, *CD99* exhibited the highest differential expression in GBM relative to normal brain tissue. We present the *CD99* gene and protein expression pattern in a series of astrocytic tumours covering all grades of malignancies. We also describe for

the first time an immunohistochemical localisation profile of *CD99* across different tumour grades and show the involvement of *CD99* in migration property of GBM cell lines.

Materials and methods

Tissue samples and ethical statement

Fresh surgical samples of astrocytomas of different grades and of non-tumoural tissue of the CNS (temporal lobectomy from epilepsy surgeries) were obtained during surgery by the Neurosurgery Group of the Department of Neurology at Hospital das Clínicas, School of Medicine, University of São Paulo. Samples were macrodissected and immediately snap-frozen in liquid nitrogen upon surgical removal. The astrocytoma specimens were categorised according to the WHO grading system [2]. The studied series consisted of 23 pilocytic astrocytoma (AGI), 26 low-grade astrocytoma (AGII), 17 anaplastic astrocytoma (AGIII), 84 GBM, and 19 non-neoplastic (NN) cases. Prior to RNA extraction, a 4- μ m-thick section of each sample was obtained for histological assessment under light microscopy after haematoxylin-eosin staining. Necrotic and non-neoplastic areas were removed from the frozen block of tumoural tissues by microdissection, and RNA extraction was performed. Grey matter was avoided in the control samples, and white matter was exclusively present in the samples used for RNA extraction. This project was approved by the Ethical Committee of the School of Medicine, University of São Paulo, and informed consent was obtained from all patients.

Gene selection

The selection of placenta-specific genes was performed employing the MPSS libraries previously generated (<http://mpss.licr.org>) [10] to generate a list of specifically expressed genes. Another list was generated using libraries of genes expressed in tumour tissues and tumour cell lines (breast, colon, lung, and melanoma) but not expressed in the respective normal tissues. According to the intersection of these two lists, we evaluated the expression of the selected genes using the SAGE database at CGAP (<http://cgap.nci.nih.gov/>) (Electronic Supplementary Material—Table 1). For comparison, the MPSS and SAGE tag number of each library analysed was normalised by 200,000 tags. Additionally, the microarray data of GBM and non-neoplastic brain tissue (CodeLink, GE Healthcare, Piscataway, NJ) previously produced [8, 9] were also used to refine the selection of genes.

Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from frozen tissues using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). An evaluation of the RNA concentration and purity was performed by measuring the absorbance at 260 and 280 nm, and 260/280 ratios ranging from 1.8 to 2.0 were considered satisfactory for purity standards. 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 synthesised from 1 µg of total RNA previously treated with 1 unit of DNase I (FPLC-pure, GE Healthcare) using random and oligo (dT) primers, RNase inhibitor (RNaseOUT), and SuperScript III reverse transcriptase according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies, Carlsbad, USA). The resulting cDNA was subsequently treated with 1 unit of RNase H (GE Healthcare), diluted with TE buffer, and stored at -20°C until the expression analysis.

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

The relative expression levels of selected genes in sample tissues were analysed by RT-qPCR; the assays were performed in duplicate using SYBR Green I with an ABI 7500 Real-time PCR System (Life Technologies). The quantitative data for *CD99* were normalised based on the geometric mean of three housekeeping genes: ATP-binding cassette, sub-family G, member 2 (*BCRP*); glucuronidase beta (*GUSB*); and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*). For the initial analysis of selected genes, the relative expression data were calculated based on *HPRT* as a housekeeping gene. All primers were designed based on different exons to avoid DNA amplification and were synthesised by IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Primers for *CD99* were designed in common exons for both isoforms. (Electronic Supplementary Material—Table 2) shows the specific primer sequences and concentrations used for RT-qPCR. SYBR Green I amplification mixtures (12 µl) contained 3 µl of cDNA, 6 µl of $2 \times$ SYBR Green I Master Mix (Life Technologies), and forward and reverse primers. The cycle conditions included incubation at 50°C for 5 min, initial denaturation at 95°C for 10 min, and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. A DNA melting curve analysis showed a single peak for all genes, and agarose gel electrophoresis was employed to assess the size of the amplified PCR product. The equation $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ was applied to calculate the relative expression of the different malignancy grades of the astrocytoma samples *versus* the median of non-neoplastic tissues [11]. For the statistical survival analysis, the gene expression status was scored as high or

low expression in relation to the median relative expression value of the GBM cases. For functional analysis of *CD99* knocking down after siRNA transfection, the same procedures were followed, except that only *HPRT* was used as reference gene. Expression values were calculated relative to non-targeting control.

Western blotting

Total protein lysates from cell cultures after transfection with siRNA control (NTC) and siRNA specific for *CD99*, and tissue (non-neoplastic brain and astrocytomas of different malignant grades) were prepared with RIPA lysis buffer and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) on ice. Protein concentration was determined by protein assay of Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Absorbance was measured at 595 nm using a microplate spectrophotometer Multiskan Spectrum (Thermo Labsystems, Helsinki, Finland). Concentrations were determined based on a standard curve with different concentrations of bovine serum albumin. Twenty mg of total protein lysate were separated by polyacrylamide gel electrophoresis in 12 % running buffer Tris–Glycine SDS (Life Technologies). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using the iBlot dry blotting system (Life Technologies). The membrane was blocked with 5 % skimmed milk and incubated with mouse monoclonal primary anti-*CD99* (1:1,000, clone DN16, Abcam, UK). The membrane was also incubated with mouse monoclonal anti- β -actin (1:10,000, clone AC-74, Sigma-Aldrich) as a protein loading control. The secondary antibody used was anti-mouse IgG (1:1,000) conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich). The immune complex were visualised by enhanced chemiluminescence reagent (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer, Waltham, MA) and detected with the equipment ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare). Densitometry was carried out using Schion/NIH Image J software (Scion, Frederick, MD). The intensity values of *CD99* were normalized against β -actin.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed using 5-µm paraffin-embedded tissue sections subjected to antigen retrieval. Six cases of non-neoplastic brain tissue, six cases of AGI, six cases AGII, five cases of AGIII, and 11 cases of GBM were subjected to an immunohistochemical analysis. Sections of T98G and A172 cell pellets fixed and embedded in paraffin were also analysed. In summary, the 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). The

specimens were then blocked and incubated with an anti-CD99 antibody (mouse monoclonal, clone DN16, Abcam, 1:400) at 16–20 °C for 16 h. Development of the reaction was performed with a commercial kit (Novolink; Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK) at room temperature using diaminobenzidine. Harris haematoxylin was used for nuclear staining. Two observers evaluated the staining intensity of the tissue sections independently. A semi-quantitative score 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, 0.5 = less than 10 %, 1 = 10–25 %, 2 = 26–50 %, 3 = 51–75 %, and 4 = 76–100 %. For the non-neoplastic tissue samples, only glial cell immunostaining was considered for scoring. Only cases with positive cell staining with scores ≥ 2 were interpreted as positive. Digital photomicrographs of representative fields were captured and processed using Picasa 3 (Google, USA).

Cell culture and migration assay

The human malignant GBM cell lines T98G, A172 and U87MG, were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and maintained in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Life Technologies) supplemented with 10 % heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (Life Technologies), 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ in air. Dicer-substrate small interference RNA (siRNA) duplexes for CD99 knockdown (5'-CUUU-GACUUAGGAGAUGCUGUUGTT-3') were diluted in buffer provided by IDT. U87MG and A172 cells (1×10^5 cells/well) were seeded in a six-well plate and transfected after 24 h with Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies). Control cells were transfected with a scrambled non-target control (NTC) siRNA from IDT. siRNAs for both CD99 and NCT were used at a final concentration of 1nM and the CD99 knocking down 2 days after transfection were evaluated by RT-qPCR and Western blotting. For migration analysis, the cells were detached from their culture surfaces using PBS, and 2.5×10^4 cells were suspended in 0.5 ml DMEM supplemented with 1 % FBS and added to the upper compartment of noncoated transwell polycarbonate membrane insert with 8.0-µm pores (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ). The bottom chamber contained 1.0 mL DMEM supplemented with 10 % FBS. The cells were incubated at 37 °C; after 20 h, fixed with 3.7 % formaldehyde for 15 min and stained with 0.1 % crystal violet dye (Sigma-Aldrich) for 15 min. The non-migrating cells present in the upper compartment were removed with a cotton swab. The membrane was rinsed with PBS to remove excess staining

and air-dried. The migrating cells were analysed directly using an inverted microscope and counted (at 40× magnification) in 10 random fields per well. Two independent experiments were analysed, and each experiment was performed in duplicate. Values of migration were expressed as the average of migrated cells per microscope field.

Statistical analysis

The statistical analysis of the relative gene expression in non-neoplastic samples and GBM samples was performed using Student's *t* test. The difference in the gene and protein expression of different grades of astrocytoma or in GBM cases according to lesion localisation was assessed using the Kolmogorov–Smirnov normality test, and the non-parametric Kruskal–Wallis and Dunn tests. The Kaplan–Meier survival curve was analysed using the *log-rank* (Mantel Cox) test and a multivariate analysis using the Cox proportional hazards model. The logistic regression model included the following parameters: age at diagnosis, gender (female *versus* male), and gene expression status (hyper- or hypo-expression). For migration assays, comparisons between cells transfected with siRNA for CD99 and NTC were performed by using Mann–Whitney test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. The calculations were performed using GraphPad Prism (San Diego, CA) and SPSS for Windows, Version 15.0 (Chicago, IL).

Results

Selection of genes with high expression in placenta and in tumours

We interrogated the interface database MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing Technology) (<http://mpss.licr.org>) [10] for genes with high expression in the placenta. In addition, a second search was undertaken for genes expressed in tumour tissues and tumour cell lines (breast, colon, lung, and melanoma) but not expressed in respective normal tissues from libraries in MPSS. The intersection of these two lists resulted in 390 genes. To further refine the selection, the 390 selected genes were compared with the serial analysis of gene expression (SAGE) libraries of non-neoplastic brain tissue and astrocytomas (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>). Supplementary Table S1 provides information about the SAGE libraries used in this study. In addition, we used microarray data of three independent GBM samples and a non-neoplastic brain tissue pool of CNS produced in our laboratory [8, 9] to restrict the gene search. These data were analysed together, and the following exclusion criteria were established: (1) genes with low expression in astrocytomas (175

genes); (2) genes encoding ribosomal proteins (25 genes) and collagen chains (6 genes); (3) genes that showed inconsistent high expression in microarray data (19 genes); and (4) genes that were not found in the microarray data (28 genes). We selected 137 genes overexpressed in astrocytomas, 79 of which were excluded due to high expression in non-neoplastic brain tissue. Thus, we selected 58 genes with increased expression in astrocytomas and placenta and low expression in non-neoplastic brain tissue. An analysis of the function and localisation (preferably membrane) of these genes in addition to a revision of the literature was performed. Five genes were excluded because they had already been described in astrocytomas (validating our strategy of selecting genes relevant in astrocytoma tumorigenesis), and 30 other genes because they had no related function to the tumorigenic process. The expression of the remaining 23 genes was analysed in normal tissues using the MPSS and SAGE databases. Therefore, genes that showed increased expression in normal tissues were excluded (11), resulting in 12 genes selected for validation by qRT-PCR in 10 non-neoplastic brain tissues and 20 GBM samples. Table 1 shows the relative expression data (median and lower and higher values) of the 12 genes overexpressed in placenta and astrocytomas. *CD99* was the gene with the highest GBM median expression values among the 12 genes analysed.

CD99 expression profile in astrocytomas of all grades of malignancy

To investigate the possible involvement of *CD99* in the processes of transformation and progression, we performed

Table 1 Relative gene expression by quantitative real-time PCR in 10 non-neoplastic brain tissue and 20 glioblastoma (GBM) samples

Gene	Non-neoplastic	GBM	<i>p</i>
<i>CCNB1IP1</i>	0.99 (0.43–2.20)	3.44 (1.86–8.54)	<0.0001
<i>CD99</i>	1.11 (0.41–2.71)	111.67 (21.50–225.35)	<0.0001
<i>CNN3</i>	1.06 (0.55–1.95)	22.26 (5.94–57.88)	<0.0001
<i>EIF4G2</i>	1.00 (0.49–1.93)	7.62 (3.06–18.57)	<0.0001
<i>MAPKAP1</i>	0.98 (0.62–1.89)	5.72 (2.71–12.23)	<0.0001
<i>MIF</i>	0.98 (0.63–1.58)	4.79 (2.12–12.56)	<0.0001
<i>PMP22</i>	1.15 (0.46–2.46)	14.05 (1.47–49.01)	<0.0001
<i>RNF5</i>	1.03 (0.35–2.39)	6.89 (1.28–20.92)	0.0001
<i>SI00A10</i>	0.96 (0.15–4.63)	35.43 (8.18–111.97)	<0.0001
<i>TEGT</i>	1.11 (0.38–1.77)	5.90 (1.11–14.71)	<0.0001
<i>TNFRSF12A</i>	1.28 (0.47–2.79)	29.14 (0.77–48.28)	<0.0001
<i>UFC1</i>	1.09 (0.42–2.48)	3.54 (2.08–8.06)	<0.0001

The expression values are shown as the median (the lowest and highest values in each sample group). HPRT was used as the endogenous reference

Bold values signifies the highest median value for the GBM samples

a qRT-PCR analysis using a larger number of astrocytoma samples with all grades of malignancy (grades I–IV) and non-neoplastic brain tissue. As shown in Fig. 1a, the relative expression levels of *CD99* showed a great variability in all grades of astrocytomas, with significant differences when compared all the groups analysed (non-neoplastic and astrocytomas) ($p < 0.0001$). Among the diffusely infiltrating astrocytomas, the *CD99* expression values

Fig. 1 *CD99* expression profile in astrocytomas according to WHO grade and non-neoplastic brain tissues. **a** *CD99* transcript levels were determined by quantitative real-time PCR in 19 non-neoplastic (NN), 23 pilocytic astrocytoma (AGI), 26 low-grade astrocytoma (AGII), 17 anaplastic astrocytoma (AGIII), and 84 GBM cases. The relative expression values were calculated based on the geometric mean of the *BCRP*, *GUSB*, and *HPRT* expression levels of each sample and the non-neoplastic brain values. The horizontal bars show the relative mean *CD99* expression of each group: NN = 1.23; AGI = 16.77; AGII = 7.68; AGIII = 14.62; GBM = 17.47. The difference in the relative gene expression among the groups was statistically significant ($p < 0.0001$, Kruskal–Wallis test), and between NN group and each of astrocytoma groups (***) ($p < 0.0001$, Dunn's test). **b** Box-and-whiskers plots of *CD99* expression were demonstrated according to GBM localisation and extension as unilobar (1, $n = 34$), multilobar (2, two or more lobes, $n = 40$) and insula as the epicentre of the lesion (3, $n = 8$). The boxes extend from 25th to the 75th percentile and the lines in the middle are the median. The error bars extend down to the lowest value and up to the highest. Difference between group 1 and 2 were statistically significant (** $p = 0.019$), as well as between group 2 and 3 (** $p = 0.025$)

Fig. 2 CD99 immunohistochemistry of tissue sections. **a** CD99 expression and localisation were determined by immunohistochemistry in 6 non-neoplastic (NN), 6 pilocytic astrocytoma (AGI), 7 low-grade astrocytoma (AGII), 5 anaplastic astrocytoma (AGIII), and 11 glioblastoma (GBM) cases. Upper panels: Representative images of CD99 immunostaining, showing a more prevalent expression in tumours than in non-neoplastic tissue. Magnification of 400×. **b** The graphs present a semi-quantitative score that refers to the product of staining intensity and the percentage of positive cells stained with anti-CD99 in the nucleus (**a**), cytoplasm (**b**) and plasma membrane (**c**). The horizontal bars show the mean immunohistochemistry score of each group. The difference in protein expression among the groups was statistically significant for nuclear staining ($p = 0.0010$) and also for membrane and cytoplasmic staining ($p < 0.0001$ for both) using the Kruskal–Wallis test. CD99 in glial cells was scored in the control NN

increased with malignant grade among the infiltrating tumours. All four astrocytoma groups presented statistically significant higher expression when compared to non-neoplastic samples ($p < 0.0001$ for all groups). The CD99 expression levels were analysed according to localisation and extension of GBM (being 1 for unilobar; 2 for multilobar, and 3 for insular as the epicentre of the lesion). The expression levels were different among the groups ($p = 0.04977$). Results, presented in Fig. 1b, show that cases with a larger tumour extension (multilobar) have higher expression levels of CD99 than those tumours restricted to one lobe (unilobar), as well as those with insular localisation ($p = 0.019$ and $p = 0.025$, respectively). The CD99 expression levels were also correlated with clinical survival outcome for the GBM cases, although there were no differences in GBM patient's prognosis when we compared groups with high and low CD99 expression.

CD99 immunolocalisation and expression

CD99 protein expression and localisation was examined in astrocytomas (grades I–IV) and in control, non-neoplastic brain tissue, by immunohistochemistry. A semi-quantitative score system corresponding to the product of staining intensity and the percentage of cells staining positive was calculated for the immunoreactivity of the antibody in each tissue section to compare the levels of CD99 protein expression. Figure 2a shows representative cases of anti-CD99 antibody immunoreactivity, with the prevalence of CD99 expression in malignant tumours being greater than in normal tissue. The semi-quantitative analysis of each group is presented in Fig. 2b.

CD99 protein expression was found to be less intense in non-neoplastic brain tissue, with greater immunoreactivity in astrocytomas and varying with the degree of malignancy. Remarkably, when CD99 localisation was analysed in relation to tumour grade, we observed that CD99 in GBM samples was localised mostly in the cytoplasm and plasma

membrane compartments (Fig. 2b). In contrast to the malignant gliomas, no obvious staining was observed in the membrane of any of the non-neoplastic glial cells, though AGI displayed intense labelling in the nucleus (Fig. 2b). CD99 localisation among the astrocytoma groups and control samples was significantly different for nuclear ($p = 0.0010$), cytoplasm ($p < 0.0001$), and plasma membrane ($p < 0.0001$) localisation. Differential CD99 expression according to astrocytoma malignant grade was confirmed in tissue lysates of total protein by Western blotting (Fig. 3a). GBM samples presented higher expression when compared to astrocytoma of lower grades and non-neoplastic brain tissues (Fig. 3b), confirming results of CD99 at mRNA levels.

The role of CD99 in glioma cell migration

We also analysed CD99 protein expression in three cell lines derived from human GBM samples, T98G, A172 and U87MG, (Fig. 4a). The immunolocalisation of CD99 in A172 and U87MG cells was similar to that observed in the GBM samples, with a marked plasma membrane staining. In contrast, the T98G cell line presented a much weaker staining than the A172 and U87MG cells, with few cells presenting positivity in the cytoplasm and only scarce cells with CD99 at the membrane. CD99 did not localise in the nucleus of any of the cell lines. Additionally, the migration property of the three cell lines was analysed in transwell chambers, with the A172 and U87MG cells exhibiting greater migratory capacity than the T98G cells, as shown in Fig. 4a. Therefore, we analysed the effect of CD99 knockdown by siRNA in A172 and U87MG cell lines to confirm the involvement of CD99 in migration. Gene silencing was confirmed by RT-qPCR in both A172 (97 %) and U87MG (98 %) relative to NTC. Western blot confirmed the knockdown at the protein level (Fig. 4b). siRNA transfection decreased significantly the migratory property of both A172 and U87MG cells when compared to NTC control ($p < 0.0001$ for both cell lines) (Fig. 4c), confirming the role of CD99 in GBM migratory characteristics.

Discussion

Although placenta is a normal tissue, trophoblastic cells share several common features with malignant cells, including the capacity of rapid proliferation, invasion into nearby tissues, migration, new blood vessel formation, and the ability to evade the immune system. Thus, the comparison of placenta and tumours is important to our knowledge of major signalling cascades and key molecules implicated in the invasion and migration processes. The identification of these pathways and molecules can provide novel targets for the diagnosis and treatment of both cancer

Fig. 3 Expression of CD99 in astrocytomas of different malignant grades and non-neoplastic brain tissues. **a** Western blotting of CD99 of 5 samples of non-neoplastic brain tissues (NN), 4 of pilocytic astrocytomas (AGI), 4 of low-grade astrocytomas (AGII), 2 of anaplastic astrocytomas (AGIII), and 6 of glioblastomas (GBM) was

performed with 20 μ g of total protein was loaded per lane. Expression level was normalised with β -actin. **b** Relative densitometry of CD99 compared with β -actin protein. Horizontal lines indicate the means of each group. GBM samples presented higher expression of CD99 than the lower grades astrocytomas and non-neoplastic control samples

and pathological pregnancies, enabling the translation of basic research discoveries into clinical applications. Some pathways common to GBMs and trophoblasts have been described, such as the increased expression of epidermal growth factor and its receptor and vascular endothelial growth factor and its receptor [12–14].

In the present study, we searched for genes with high expression in placenta and different tumour types, with a focus on astrocytomas. Among the genes identified, we selected *CD99* and analysed its mRNA and protein expression profiles in a series of astrocytic tumours. CD99 is a transmembrane glycoprotein with a glycosylated extracellular domain, a transmembrane domain, and a short intracytoplasmic domain [15] that is encoded by the pseudoautosomal regions of the X and Y chromosomes [16–19]. Although CD99 shows broad cellular expression, its biological function and related signalling pathways are not well understood [20, 21].

CD99 encodes two distinct isoforms produced by the alternative splicing of its primary transcript: a wild-type full-length form and a short variant of 32 and 28 kDa, respectively [22]. The CD99 protein is expressed in a wide variety of normal tissues, mostly on T lymphocytes, monocytes and natural killer cells [23, 24]. Functionally, CD99 is implicated in several cellular processes, including haematopoietic cell differentiation, proliferation, and diapedesis [25, 26], cell–cell adhesion and migration [26–28], apoptosis induction [29, 30], cellular architecture maintenance [31], and transmembrane protein transport [32]. In addition to its physiological roles, increases or decreases in

CD99 expression have been associated with numerous malignancies, including anaplastic large cell lymphoma [33], haematopoietic neoplasms [33–35], breast cancer [36], Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumours [37], gallbladder carcinoma [38], hepatoblastomas [39], lung cancer [40], lymphoblastic lymphoma/leukaemia [33, 41], osteosarcoma [15], solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas [42, 43], ovarian tumours [44], Merkel cell carcinoma [45], prostate cancer [46], rhabdomyosarcoma [47, 48], and stomach cancer [49, 50].

Although data on CD99 expression in central nervous system neoplasms is sparse, there are reports on ependymomas [51, 52], astrocytomas, oligodendrogliomas, central PNETs, choroid plexus tumours, and hemangioblastomas [53, 54]. CD99 has been reported to be a good marker for distinguishing ependymomas from other nonependymal tumours and was even proposed to be useful for differentiating among the various grades of ependymoma [52]. Moreover, because ependymomas and astrocytomas are mostly positive for CD99, immunohistochemistry might constitute a tool for distinguishing these cancers from oligodendrogliomas. Ishizawa et al. [54] have also demonstrated CD99 expression in astrocytomas of all four malignant grades, although only cytoplasmic and membrane localisation was observed. In a recent study, Seol et al. showed high expression of CD99 protein in different grades of astrocytomas, although the expression was not different among the different grades of astrocytomas, and no specific subcellular localisation was mentioned [55].

Fig. 4 Effect of CD99 expression on migration of GBM cell lines. **a** CD99 expression and migration properties in the T98G, A172 and U87MG. Immunohistochemistry reaction of CD99 was performed using cell pellet paraffin-embedded sections. Magnification of 400×. For the migration assay, 25,000 cells were seeded in the upper chamber of a transwell chamber. After 20 h of incubation, the cells in the lower chamber were fixed and stained. Magnification of 40×. CD99 higher expression in membrane and higher migratory capacity was observed in A172 and U87MG cells lines. Both cells were

examined for *CD99* knockdown 48 h following transfection with siRNA for CD99 and non-targeting control (NTC). **b** Western blot of cell lysates using antibodies against CD99 and β-actin confirmed silencing at the protein level. **c** Migration assays confirming that *CD99* knockdown affects GBM cell lines migratory properties, diminishing significantly the number of cells when compared to control NTC. Data represent the number of migrated cells per field in each condition for both cell lines (means ± standard errors of the means, *** $p < 0.0001$, Mann–Whitney test)

We characterised CD99 expression in a large cohort of astrocytic tumours (150 samples) and confirmed higher CD99 mRNA and protein expression in diffusely infiltrating astrocytomas compared to non-neoplastic brain tissue. These results were confirmed by Western blot, with GBMs, the most malignant astrocytoma, presenting the higher CD99 protein levels. While differences in gene expression levels among the different grades of astrocytoma were not significant, the localisation of the protein proved to be quite different, primarily in the cytoplasm and plasma membrane in grade III and IV (GBM) astrocytomas, and predominantly in the nucleus in lower grade (I and II) astrocytomas, a result that was similar to the pattern observed in non-neoplastic brain. Focal or diffuse membranous and

cytoplasmic staining for CD99 have already been reported by others [24, 36, 44, 46, 56–58]. Although CD99 protein trafficking according to the grade of malignancy is a new observation, we need to perform an immunohistochemistry analysis in a larger series of astrocytomas and/or conduct functional studies of the difference of migration activity according to CD99 localisation.

Recently, an enhancement of migration and invasiveness of GBM cells was observed with the expression and activation of wild-type CD99 in association with morphological alterations and increased adhesiveness in glioma cells [55]. Our present results demonstrating the localisation of the CD99 protein at the plasma membrane in more aggressive and malignant astrocytomas corroborate these

previous in vitro observations. It is also interesting to note that high CD99 protein expression in non-invasive pilocytic astrocytomas was demonstrated mainly in the nucleus and cytoplasm but not at the plasma membrane [55]. Further evidence for this hypothesis is our finding that cell line T98G, with diminished migratory capacity, exhibited very few cells with CD99 membrane localisation when compared to the highly migratory A172 and U87MG cell lines, which showed CD99 predominantly staining at the plasma membrane. These observations were confirmed by migration assays of both cells after CD99 knockdown by siRNA. Another evidence of CD99 involvement in GBM invasive ability was the higher expression in tumours presenting larger extension of localisation (localised in two or more lobes). New observations of CD99 expression rates and localisation (a cytoplasmic dot-like pattern) have also been observed in different type of tumours, such as anaplastic large cell lymphoma [33], neoplasm of the pancreas [42, 43], and Merkel cell carcinoma [45]. However, differential CD99 protein localisation according to malignancy, as we observed in the present study, has not been presented in any of these previous reports. The different staining patterns might be due to the different antibody clones used and to different immunohistochemistry procedures, including the process used for antigen retrieval.

In conclusion, this study presents for the first time *CD99* mRNA and protein expression profiles across a large series of astrocytomas covering all grades of malignancy. We found increased expression of *CD99* in all malignant grades of astrocytoma, with GBMs showing the highest values among diffusely infiltrating astrocytomas, although no correlation with GBM patients' overall survival could be demonstrated. Additionally, we found that CD99 protein localisation was different according to the grade of malignancy. Further research focusing on CD99 protein function and localisation should elucidate the mechanism by which this protein contributes to the increase in malignancy in astrocytomas. Moreover, our data suggests CD99 as a possible therapeutic target especially for the most malignant astrocytomas (GBM), which overexpress CD99 at the plasma membrane.

Acknowledgments 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 grants #04/12133-6 and #06/56989-7, São Paulo Research Foundation (FAPESP), the Ludwig Institute for Cancer Research, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Fundação Faculdade de Medicina (FFM).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical standards The experiments comply with the current laws of Brazil.

References

- Chen J, McKay RM, Parada LF (2012) Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell* 149:36–47
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2:97–109
- Reifenberger G, Collins VP (2004) Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 82:656–670
- Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445–1453
- Ohgaki H, Kleihues P (2011) Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol* 28:177–183
- Westermarck B (2012) Glioblastoma—a moving target. *Upsala J Med Sci* 117:251–256
- Soundararajan R, Rao AJ (2004) Trophoblast ‘pseudo-tumorigenesis’: significance and contributory factors. *Reprod Biol Endocrinol* 2:15
- Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Lopes L, Nagahashi SK (2007) Expression of HOXC9 and E2F2 are up-regulated in CD133 (+) cells isolated from human astrocytomas and associate with transformation of human astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1769:437–442
- Marie SK, Okamoto OK, Uno M, Hasegawa AP, Oba-Shinjo SM, Cohen T, Camargo AA, Kosoy A, Carlotti CG Jr, Toledo S, Moreira-Filho CA, Zago MA, Simpson AJ, Caballero OL (2008) Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int J Cancer* 122:807–815
- Jongeneel CV, Delorenzi M, Iseli C, Zhou D, Haudenschild CD, Khrebtkova I, Kuznetsov D, Stevenson BJ, Strausberg RL, Simpson AJ, Vasicsek TJ (2005) An atlas of human gene expression from massively parallel signature sequencing (MPSS). *Genome Res* 15:1007–1014
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408
- Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashima T, Yamashima J, Yamamoto H (1998) Placenta Growth Factor (PIGF) mRNA expression in brain tumors. *J Neurooncol* 10:123–130
- Ferreti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D (2007) Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update* 13:121–141
- Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN (2009) Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin Proc* 84:985–1000
- Manara MC, Bernard G, Lollini PL, Nanni P, Zuntini M, Landuzzi L, Benini S, Lattanzi G, Sciandra M, Serra M, Colombo MP, Bernard A, Picci P, Scotlandi K (2006) CD99 acts as an onco-suppressor in osteosarcoma. *Mol Biol Cell* 17:1910–1921
- Levy R, Dilley J, Fox RI, Warnke R (1979) A human thymus-leukemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6552–6556
- Goodfellow P, Banting G, Sheer D, Ropers HH, Caine A, Ferguson-Smith MA, Povey S, Voss R (1983) Genetic evidence that a Y-linked gene in man is homologous to a gene on the X chromosome. *Nature* 302:346

18. Petit C, Levilliers J, Weissenbach J (1988) Physical mapping of the human pseudoautosomal region; comparison with genetic linkage map. *EMBO J* 7:2369–2376
19. Banting GS, Pym B, Darling SM, Goodfellow PN (1989) The MIC2 gene product: epitope mapping and structural prediction analysis define an integral membrane protein. *Mol Immunol* 26:181–188
20. Khunkaewla P, Chiampanichayakul S, Yasamut U, Pata S, Kasinrerk W (2007) Production, characterization, and functional analysis of newly established CD99 monoclonal antibodies MT99/1 and MT99/2. *Hybridoma* 26:241–250
21. Moreira CK, Templeton TJ, Lavazec C, Hayward RE, Hobbs CV, Kroeze H, Janse CJ, Waters AP, Sinnis P, Coppi A (2008) The Plasmodium TRAP/MIC2 family member, TRAP-Like Protein (TLP), is involved in tissue traversal by sporozoites. *Cell Microbiol* 10:1505–1516
22. Hahn JH, Kim MK, Choi EY, Kim SH, Sohn HW, Ham DI, Chung DH, Kim TJ, Lee WJ, Park CK, Ree HJ, Park SH (1997) CD99 (MIC2) regulates the LFA-1/ICAM-1-mediated adhesion of lymphocytes, and its gene encodes both positive and negative regulators of cellular adhesion. *J Immunol* 159:2250–2258
23. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M (1991) MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 67:1886–1893
24. Gordon MD, Corless C, Renshaw AA, Beckstead J (1998) CD99, keratin, and vimentin staining of sex cord-stromal tumors, normal ovary, and testis. *Modern Pathol* 11:769–773
25. Bernard G, Raimondi V, Alberti I, Pourteu M, Widjenes J, Ticchioni M, Bernard A (2000) CD99 (E2) up-regulates alpha-4beta1-dependent T cell adhesion to inflamed vascular endothelium under flow conditions. *Eur J Immunol* 30:3061–3065
26. Lou O, Alcaide P, Luscinskas FW, Muller WA (2007) CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *J Immunol* 178:1136–1143
27. Pata S, Otáhal P, Brdička T, Laopajon W, Mahasongkram K, Kasinrerk W (2011) Association of CD99 short and long forms with MHC class I, MHC class II and tetraspanin CD81 and recruitment into immunological synapses. *BMC Res Notes* 4:293
28. Torzicky M, Viznerova P, Richter S, Strobl H, Scheinecker C, Foedinger D, Riedl E (2012) Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and CD99 are critical in lymphatic transmigration of human dendritic cells. *J Invest Dermatol* 132:1149–1157
29. Alberti I, Bernard G, Rouquette-Jazdanian AK, Pelassy C, Pourteu M, Aussel C, Bernard A (2002) CD99 isoforms expression dictates T cell functional outcomes. *FASEB J* 16:1946–1948
30. Bixel MG, Li H, Petri B, Khandoga AG, Khandoga A, Zarbock A, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Sorokin L, Zeuschner D, Maerz S, Butz S, Krombach F, Vestweber D (2010) CD99 and CD99L2 act at the same site as, but independently of, PECAM-1 during leukocyte diapedesis. *Blood* 116:1172–1184
31. Cerisano V, Aalto Y, Perdichizzi S, Bernard G, Manara MC, Benini S, Cenacchi G, Preda P, Lattanzi G, Nagy B, Knuutila S, Colombo MP, Bernard A, Picci P, Scotlandi K (2004) Molecular mechanisms of CD99-induced caspase-independent cell death and cell–cell adhesion in Ewing's sarcoma cells: actin and zyxin as key intracellular mediators. *Oncogene* 23:5664–5674
32. Vestweber D (2007) Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation through endothelial cell contacts. *Ernst Schering Found Symp Proc* 3:151–167
33. Buxton D, Bacchi CE, Gualco G, Weiss LM, Zuppan CW, Rowsell EH, Huang Q, Wang J (2009) Frequent expression of CD99 in anaplastic large cell lymphoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 160 cases. *Am J Clin Pathol* 131:574–579
34. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, Printz D, Fröschl G, Buchinger P, Mann G, Gadner H (1999) CD99 (MIC2) expression in paediatric B-lineage leukaemia/lymphoma reflects maturation-associated patterns of normal B-lymphopoiesis. *Br J Haematol* 105:690–695
35. Terada T (2012) TDT (–), KIT (+), CD34 (+), CD99 (+) precursor T lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol* 5:167–170
36. Milanezi F, Pereira EM, Ferreira FV, Leitão D, Schmitt FC (2001) CD99/MIC-2 surface protein expression in breast carcinomas. *Histopathology* 39:578–583
37. Fong YE, López-Terrada D, Zhai QJ (2008) Primary Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor of the vulva. *Hum Pathol* 39:1535–1539
38. Choi YL, Xuan YH, Shin YK, Chae SW, Kook MC, Sung RH, Youn SJ, Choi JW, Kim SH (2004) An immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in gallbladder lesions. *J Histochem Cytochem* 52:591–601
39. Ramsay AD, Bates AW, Williams S, Sebire NJ (2008) Variable antigen expression in hepatoblastomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 16:140–147
40. Edlund K, Lindskog C, Saito A, Berglund A, Pontén F, Göransson-Kultima H, Isaksson A, Jirstrom K, Planck M, Johansson L, Lambe M, Holmberg L, Nyberg F, Ekman S, Bergqvist M, Landelius P, Lamberg K, Botling J, Ostman A, Micke P (2012) CD99 is a novel prognostic stromal marker in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 131:2264–2273
41. Kang LC, Dunphy CH (2006) Immunoreactivity of MIC2 (CD99) and terminal deoxynucleotidyl transferase in bone marrow clot and core specimens of acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes. *Arch Pathol Lab Med* 130:153–157
42. Li L, Li J, Hao C, Zhang C, Mu K, Wang Y, Zhang T (2011) Immunohistochemical evaluation of solid pseudopapillary tumors of the pancreas: the expression pattern of CD99 is highly unique. *Cancer Lett* 310:9–14
43. Guo Y, Yuan F, Deng H, Wang HF, Jin XL, Xiao JC (2011) Paranuclear dot-like immunostaining for CD99: a unique staining pattern for diagnosing solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 35:799–806
44. Choi YL, Kim HS, Ahn G (2000) Immunoreactivity of inhibin α subunit, inhibin/activin βA subunit and CD99 in ovarian tumors. *Arch Pathol Lab Med* 124:563–569
45. Rajagopalan A, Browning D, Salama S (2013) CD99 expression in Merkel cell carcinoma: a case series with an unusual paranuclear dot-like staining pattern. *J Cutan Pathol* 40:19–24
46. Kommos F, Oliva E, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Amin MB, Bhan AK, Young RH, Scully RE (2000) Inhibin-alpha CD99, HEA125, PLAP, and chromogranin immunoreactivity in testicular neoplasms and the androgen insensitivity syndrome. *Hum Pathol* 31:1055–1061
47. Folpe AL, McKenney JK, Bridge JA, Weiss SW (2002) Sclerosing rhabdomyosarcoma in adults: report of four cases of a hyalinizing, matrix-rich variant of rhabdomyosarcoma that may be confused with osteosarcoma, chondrosarcoma, or angiosarcoma. *Am J Surg Pathol* 26:1175–1183
48. Euscher ED, Deavers MT, Lopez-Terrada D, Lazar AJ, Silva EG, Malpica A (2008) Uterine tumors with neuroectodermal differentiation: a series of 17 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 32:219–228
49. Jung KC, Park WS, Bae YM, Hahn JH, Hahn K, Lee H, Lee HW, Koo HJ, Shin HJ, Shin HS, Park YE, Park SH (2002) Immunoreactivity of CD99 in stomach cancer. *J Korean Med Sci* 17:483–489
50. Lee JH, Kim SH, Wang LH, Choi YL, Kim YC, Kim JH, Park TS, Hong YC, Shin YK (2007) Clinical significance of CD99

- downregulation in gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 13:2584–2591
51. Choi YL, Chi JG, Suh YL (2001) CD99 immunoreactivity in ependymoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9:125–129
  52. Mahfouz S, Aziz AA, Gabal SM, El-Sheikh S (2008) Immunohistochemical study of CD99 and EMA expression in ependymomas. *Medscape J Med* 10:41
  53. Ishizawa K, Komori T, Hirose T (2005) Stromal cells in hemangioblastoma: neuroectodermal differentiation and morphological similarities to ependymoma. *Pathol Int* 55:377–385
  54. Ishizawa K, Komori T, Shimada S, Hirose T (2008) Olig2 and CD99 are useful negative markers for the diagnosis of brain tumors. *Clin Neuropathol* 27:118–128
  55. Seol HJ, Chang JH, Yamamoto J, Romagnuolo R, Suh Y, Weeks A, Agnihotri S, Smith CA, Rutka JT (2012) Overexpression of CD99 increases the migration and invasiveness of human malignant glioma cells. *Genes Cancer* 3:535–549
  56. Machen SK, Fisher C, Gautam RS, Tubbs RR, Goldblum JR (1998) Utility of cytokeratin subsets for distinguishing poorly differentiated synovial sarcoma from peripheral primitive neuroectodermal tumour. *Histopathology* 33:501–507
  57. Yoo SH, Han J, Kim TJ, Chung DH (2005) Expression of CD99 in pleomorphic carcinomas of the lung. *J Korean Med Sci* 20:50–55
  58. Hartel PH, Fanburg-Smith JC, Frazier AA, Galvin JR, Lichy JH, Shilo K, Franks TJ (2007) Primary pulmonary and mediastinal synovial sarcoma: a clinicopathologic study of 60 cases and comparison with five prior series. *Modern Pathol* 20:760–769