THAIS FERNANDA DE ALMEIDA GALATRO

**Estudo das associações moleculares de *ID4* em
astrocitomas difusamente infiltrativos**

SÃO PAULO

2013

THAIS FERNANDA DE ALMEIDA GALATRO

**Estudo das associações moleculares de *ID4* em
astrocitomas difusamente infiltrativos**

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

Programa de Neurologia
Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue
Nagahashi Marie

SÃO PAULO

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Galatro, Thais Fernanda de Almeida

Estudo das associações moleculares de *ID4* em astrocitomas
difusamente infiltrativos / Thais Fernanda de Almeida Galatro. -- São
Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo.

Programa de Neurologia.

Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.Astrocitoma 2.Glioblastoma 3.Proteínas inibidoras de
diferenciação 4.Expressão gênica 5.Genes *TP53*/genética

USP/FM/DBD-038/13

A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda Ciência e toda Arte.

Albert Einstein

Para meu pai, que estaria
orgulhoso do que sua
“sapinha” fez.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus.

Agradeço a toda minha família, pelo amor e apoio incondicional que demonstram tanto e sempre. À minha mãe Creusa, maior fonte de sabedoria e inspiração que irei conhecer, agradeço tanto e por tantas coisas que me faltam palavras. À minha irmã Barbara (Babosa), pelas conversas semi-científicas e todo carinho desprendido. À minha adorável sobrinha Nasta, pelos tão necessários momentos de descontração e pela imprescindível liberação do computador. E em especial, à minha irmã Cintia (Quica), que muito auxiliou na correção dessa dissertação, dedicando seu tempo e sua paciência ao meu benefício. Obrigada, Quica!

Agradeço à Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie, minha orientadora, por todas as oportunidades concedidas, pela confiança, por todos os ensinamentos – os científicos e os não-científicos –, por toda a ajuda e pelo carinho ao longo dos anos. Sua contribuição para meu crescimento científico, profissional e pessoal é inestimável.

Agradeço à Dra. Sueli Mieko Oba-Shinjo, minha conselheira para assuntos aleatórios e a quem devo mais do que algumas almas. Obrigada por todo auxílio e todos os conselhos nas horas de maior necessidade e por sempre transmitir sua serenidade quando mais precisei.

Agradeço às colegas de trabalho e amigas do LIM-15: Roseli e Mazé, pelo apoio, descontração e por participarem de forma ativa e benéfica da minha jornada ao longo dos anos; e em especial à Miyuki, por compartilhar os dados de seus trabalhos prévios, sem os quais essa dissertação não seria possível, pelos momentos de “rachar a cuca” e todos os ensinamentos científicos que tanto engrandecem minha vida profissional. Agradeço também ao grupo de Biologia Celular e Molecular do LIM-15 como um todo, em especial a Célia, Rosa, Luís Lucas, Eliene e Paula, que tanto auxiliaram e contribuíram para meu bem-estar pessoal e profissional.

Agradeço às amigas Ester, Gisele e Bruna. À Ester, por seu apoio e presença desde a primeira “Eureka!” e em todos os momentos vindouros, agradeço por ser sempre minha pílula de alegria. À Gisele, pelos conselhos e histórias compartilhadas, pela seriedade e leveza com as quais sempre me auxiliou. À Bruna, por me permitir ensinar e ao mesmo tempo aprender, ajudar e ser ajudada de igual forma, sempre.

Agradeço aos amigos de longa data, Franciele e Rodrigo. À primeira, por compartilharmos tudo, desde pensamentos, ideias, sentimentos, opiniões e lanches do McDonalds, até o gosto pela Ciência. E ao segundo, meu parceiro no crime há quase vinte anos, agradeço suas palavras, presentes em todos os momentos desde a primeira infância. Vocês me fazem entender melhor o que é amizade a cada dia que passa. Agradeço à amiga Mariá Munhoz, que me guiou até aqui nos caminhos da Ciência. Aos amigos Daniele Barbosa, Diego, Matheus, Rafael e Thiago: sua mera presença e lembrança tornam a vida mais colorida.

Agradeço ao Departamento de Anatomia Patológica, ao Grupo de Cirurgia de Epilepsia e ao Grupo de Tumores Encefálicos e Metástases da Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Instituto Central do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

E por último, e não menos importante, a todos os pacientes incluídos no Projeto Genoma Clínico e do complexo HC-FMUSP, que mesmo através do sofrimento, têm fé na Ciência e esperança no futuro, permitindo a realização deste trabalho. Sem eles, este estudo não seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. REVISÃO DA LITERATURA	3
1.1.1. ESTRUTURA DE IDs	3
1.1.2. ATIVAÇÃO DOS GENES ID	6
1.1.3. FUNÇÃO	9
1.1.3.1. Desenvolvimento embrionário	9
1.1.3.2. Ciclo celular e proliferação	10
1.1.3.3. Angiogênese	12
1.1.3.4. Tumorigênese	13
1.1.3.4.1. ID1	13
1.1.3.4.2. ID2	14
1.1.3.4.3. ID3	15
1.1.3.4.4. ID4	15
1.1.4. LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DAS PROTEÍNAS IDs	16
1.1.5. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	17
1.1.5.1. ID4	18
1.1.5.2. SOX2	18
1.1.5.3. OCT-4	19
1.1.5.4. NANOG	20
1.1.5.5. CD133	20
1.1.6. TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	21
1.1.6.1. Astrocitomas	22
1.1.6.1.1. Astrocitoma pilocítico	22
1.1.6.1.2. Astrocitomas difusamente infiltrativos	23
1.1.7. REEXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À EMBRIOGÊNESE EM TUMORES	26
2. OBJETIVOS	28
3. METODOLOGIA	29
3.1. Extração de DNA e RNA	29
3.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição Reversa	29
3.3. Desenho de <i>primers</i> para qRT-PCR	29
3.4. PCR Quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	30
3.5. Quantificação relativa de expressão gênica	32

3.6. Análise do perfil de mutação de <i>TP53</i>	32
3.7. Imunohistoquímica	33
3.8. Análise por microscopia óptica	34
3.9. Casuística	34
3.10. Análises estatísticas	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Análise da expressão relativa de <i>ID4</i> em astrocitomas	37
4.2. Análise do impacto da hiperexpressão de <i>ID4</i> na sobrevida de pacientes com GBM	38
4.3. Análise da expressão relativa de <i>SOX2</i> e correlação com a expressão relativa de <i>ID4</i>	39
4.4. Análise da expressão relativa de <i>SOX4</i> , <i>OCT-4</i> , <i>NANOG</i> e <i>CD133</i>	41
4.5. Análise da correlação entre <i>ID4</i> e <i>SOX4</i> , <i>OCT-4</i> , <i>NANOG</i> e <i>CD133</i>	43
4.6. Análise de mutação de <i>TP53</i> em astrocitomas difusos	45
4.7. Análise da associação de mutações em <i>TP53</i> e expressão relativa de <i>ID4</i> , <i>SOX2</i> , <i>SOX4</i> , <i>OCT-4</i> , <i>NANOG</i> e <i>CD133</i>	46
4.8. Análise da expressão proteica de <i>ID4</i> , <i>SOX2</i> e <i>SOX4</i> em amostras de AGII e GBM	48
4.9. Análise de impacto na sobrevida dos pacientes de GBM em grupos apresentando hipo e hiperexpressão de <i>ID4</i> , <i>SOX2</i> , <i>SOX4</i> , <i>OCT-4</i> , <i>NANOG</i> e <i>CD133</i>	49
5. DISCUSSÃO	51
5.1. Níveis de mRNA de <i>ID4</i> elevados em astrocitomas em comparação ao tecido não neoplásico	51
5.2. Hiperexpressão de <i>ID4</i> induzida pela proteína mutada de <i>TP53</i> em AGII	51
5.3. Associação da expressão de <i>ID4</i> com a expressão de <i>SOX2</i> , <i>SOX4</i> e mutações em <i>TP53</i>	52
5.4. Impacto da hiperexpressão mútua de <i>ID4</i> , <i>SOX4</i> e <i>OCT-4</i> na sobrevida dos pacientes de GBM primário	54
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8. ANEXOS	70
8.1. Anexo 1	71
8.2. Anexo 2	77
8.3. Anexo 3	78
8.4. Anexo 4	79
8.5. Anexo 5	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AGI Astrocitoma pilocítico ou grau I
AGII Astrocitoma de baixo grau ou grau II
AGIII Astrocitoma anaplásico ou grau III
ATP Adenosina Trifosfato
CD133 prominina 1
cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar
C-terminal Carboxil-terminal
DNA ácido desoxirribonucleico
dNTP Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
FMUSP Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GBM Glioblastoma multiforme
HC Hospital das Clínicas
HCl Ácido clorídrico
H&E Hematoxilina-eosina
ID Inibidores da ligação do DNA/diferenciação
KCl Cloreto de potássio
kDa Kilodalton
mg Miligrama
mM Milimolar
mRNA RNA mensageiro
NaCl Cloreto de sódio
Nanog Nanog homeobox
ng Nanograma
N-terminal Amino-terminal
OCT-4 Octamer binding protein 4
OMS Organização mundial da saúde
p Braço curto do cromossomo
p Probabilidade
pb Pares de bases

PBS Solução tampão fosfato salina
PCR Reação em cadeia polimerase
pH Potencial de hidrogênio
q Braço longo do cromossomo
qRT-PCR PCR quantitativo em tempo real
r Coeficiente de correlação
RNA Ácido ribonucléico
rpm Rotações por minuto
RT-PCR Transcriptase Reversa PCR
SDS Dodecil sulfato de sódio
SNC Sistema nervoso central
SOX SRY (sex determining region Y)
TAE Tris-acetato EDTA
TE Tris-EDTA
TP53 tumor protein p53 gene
UV Ultra violeta
 μ L Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura proteica de ID1-4

Figura 2: Comparação da estrutura proteica de outros membros da família HLH com a estrutura proteica de ID.

Figura 3: BMPs, seus receptores e SMADs ativadas.

Figura 4: Regulação da transcrição dos genes *ID*.

Figura 5: Papel de ID1 e ID2 na repressão da proteína retinoblastoma.

Figura 6: ID4 na tumorigênese.

Figura 7: A localização subcelular de IDs influencia em sua ação.

Figura 8: Distribuição dos gliomas quanto ao subtipo histológico.

Figura 9: Alterações moleculares já descritas na progressão dos astrocitomas.

Figura 10: Gráfico de dispersão representando a expressão relativa do gene *ID4*.

Figura 11: Gráficos de dispersão representando a expressão relativa do gene *ID4*.

Figura 12: Curva de sobrevida relativa aos níveis de expressão de *ID4*.

Figura 13: Gráfico de dispersão representando a expressão relativa do gene *SOX2*.

Figura 14: Correlação das expressões relativas dos genes *ID4* e *SOX2* entre amostras de astrocitoma de baixo grau, astrocitoma anaplásico e glioblastoma.

Figura 15: Gráficos de dispersão representando a expressão relativa dos genes *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133*.

Figura 16: Correlação das expressões relativas dos genes *ID4* e *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133* entre amostras de astrocitoma de baixo grau, astrocitoma anaplásico e glioblastoma.

Figura 17: Comparação dos níveis de expressão gênica relativa nos casos de AGII mutados e selvagens para *TP53*.

Figura 18: *Heatmap* demonstrando os dados de expressão gênica relativa de *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133* em amostras de astrocitomas de baixo grau, anaplásico e GBM primários e secundários de acordo com o *status* mutacional de *TP53*.

Figure 19: Secções de corte da imunohistoquímica de *ID4*, *SOX2* e *SOX4* em amostras de: astrocitoma grau II (AGII) com *TP53* selvagem, AGII com *TP53* mutado, GBM primário, GBM secundário.

Figura 20: Curva de sobrevida dos pacientes de GBM com níveis de expressão relativa de *ID4*, *SOX4* e *OCT-4* altos e baixos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das diferenças estruturais dos genes *ID*

Tabela 2. Classificação dos fatores de transcrição da família bHLH

Tabela 3. Ativadores da transcrição dos genes *ID*

Tabela 4. Sequencia de nucleotídeos, tamanho do produto, concentração final e eficiência utilizados na reação de qRT-PCR

Tabela 5. Anticorpos primários utilizados para imunohistoquímica e especificações

Tabela 6. Casuística do estudo

Tabela 7. Valores de mediana da expressão relativa de *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133*

Tabela 8. Mutações de *TP53* em astrocitomas difusos

Resumo

Galatro, T.F.A. Estudo das associações moleculares de *ID4* em astrocitomas difusamente Infiltrativos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O inibidor da ligação do DNA 4 (ID4) é membro da família hélice-alça-hélice de fatores de transcrição, presente durante o desenvolvimento embrionário Sistema Nervoso Central, e que tem sido associado à mutações no gene *TP53* e a ativação de *SOX2*. Juntamente com outros fatores de transcrição, ID4 está envolvido no processo de tumorigênese dos astrocitomas, contribuindo para a de-diferenciação celular, a proliferação e a quimiorresistência. Nesse estudo, nosso objetivo foi caracterizar o padrão de expressão de *ID4* em astrocitomas humanos difusamente infiltrativos de graus II a IV de malignidade, classificados de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS); correlacionar os níveis de expressão de *ID4* com os de *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4* e *NANOG*, juntamente com o *status* mutacional de *TP53*; e correlacionar os resultados com os dados de sobrevida dos pacientes com GBM. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi realizado em 130 amostras de astrocitomas para obter a expressão relativa de cada gene, mostrando hiperexpressão de todos os fatores de transcrição analisados nas amostras tumorais. Correlação positiva foi encontrada comparando a expressão relativa de ID4 em astrocitomas infiltrativos com a expressão de *SOX2* ($r=0.50$; $p<0.005$), *SOX4* ($r=0.43$; $p<0.005$) e *OCT-4* ($r=0.39$; $p<0.05$). Os resultados da análise mutacional de *TP53* permitiu comparações entre os grupos mutado e não-mutado apenas nos casos de astrocitomas de baixo grau (AGII), que demonstraram altos níveis de *ID4*, *SOX2* e *SOX4* nos casos mutados ($p<0.05$). Esse padrão foi mantido em amostras de glioblastoma (GBM) secundário e foi confirmado por imunohistoquímica. A combinação da hiperexpressão de *ID4*, *SOX4* e *OCT-4* conferiu uma menor sobrevida (mediana de 6 meses) muito menor aos pacientes de GBM do que a hipoexpressão (mediana de 18 meses). Uma vez que ID4 isoladamente e *SOX4* e *OCT-4* como um complexo ativam a transcrição de *SOX2*, é possível que múltiplas vias de ativação de *SOX2* prejudiquem o prognóstico dos pacientes de GBM. Esses resultados sugerem uma via comum para esses quatro alvos na tumorigênese dos astrocitomas, com *ID4* surgindo como um novo alvo para estudos e terapias futuras.

Descritores: 1.Astrocitoma 2.Glioblastoma 3.Proteínas inibidoras de diferenciação 4.Expressão gênica 5.Genes *TP53*/genética

Summary

Galatro, T.F.A. Molecular associations of ID4 in diffusely infiltrative astrocytomas [dissertation]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2013.

Inhibitor of DNA Binding 4 (ID4) is a member of the helix-loop-helix ID family of transcription factors, mostly present in the central nervous system during embryonic development, that has been associated with *TP53* mutation and activation of *SOX2*. Along with other transcription factors, *ID4* has been implicated in the tumorigenic process of astrocytomas, contributing to cell dedifferentiation, proliferation and chemoresistance. In this study, we aimed to characterize the *ID4* expression pattern in human diffusely infiltrative astrocytomas of World Health Organization (WHO) grades II to IV of malignancy (AGII-AGIV); to correlate its expression level to that of *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4* and *NANOG*, along with *TP53* mutational status; and to correlate the results with the clinical end-point of overall survival among glioblastoma patients. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) was performed in 130 samples of astrocytomas for relative expression, showing up-regulation of all transcription factors in tumor cases. Positive correlation was found when comparing *ID4* relative expression of infiltrative astrocytomas with *SOX2* ($r=0.50$; $p<0.005$), *SOX4* ($r=0.43$; $p<0.005$) and *OCT-4* ($r=0.39$; $p<0.05$). The results from *TP53* coding exon analysis allowed comparisons between wild-type and mutated status only in AGII cases, demonstrating significantly higher levels of *ID4*, *SOX2* and *SOX4* in mutated cases ($p<0.05$). This pattern was maintained in secondary GBM and further confirmed by immunohistochemistry. Combined hyperexpression of *ID4*, *SOX4* and *OCT-4* conferred a much lower (6 months) median survival than did hypoexpression (18 months). Because both ID4 alone and a complex of *SOX4* and *OCT-4* activate *SOX2* transcription, it is possible that multiple activation pathways of *SOX2* impair the prognosis of GBM patients. These results imply a similar pathway for these four targets in astrocytoma tumorigenesis, with *ID4* appearing to be a new target for further studies and therapies.

Descriptors: 1.Astrocytoma 2.Glioblastoma 3.Inhibitors of differentiation proteins 4. Gene expression 5. Genes *TP53*/genetics

1.INTRODUÇÃO

Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam a regiões específicas (promotoras) do DNA e controlam o fluxo da transmissão da informação genética, através da transcrição de genes específicos. Localizados no núcleo, estes podem agir sozinhos ou em complexos, ativando (através do recrutamento da RNA polimerase) ou reprimindo (através do bloqueio da ação da RNA polimerase) a transcrição. Essas proteínas estão no centro de todos os processos celulares, como a proliferação, a progressão do ciclo celular, a diferenciação e a tumorigênese.

As proteínas ID (inibidores de ligação do DNA/diferenciação – *inhibitor of DNA binding/differentiation*) são um tipo diferente de fator de transcrição, uma vez que não possuem o domínio de ligação ao DNA. Elas, no entanto, agem na repressão da transcrição através de dimerização com outros fatores de transcrição, causando o impedimento de sua ligação ao sítio específico. Por agirem principalmente no bloqueio da diferenciação celular e por serem altamente expressas em células progenitoras, as proteínas ID foram associadas a períodos de grande proliferação, bem como ao perfil indiferenciado das células.

Esse perfil condiz com aquele encontrado em tumores, onde a reexpressão de IDs desempenha papéis importantes. Nos tumores do Sistema Nervoso Central, um membro da família ID, o ID4, vem se destacando em processos como a neoangiogênese, a quimiorresistência e a manutenção tumoral através de células-tronco cancerosas. Sua associação com outros fatores de transcrição característicos de células progenitoras, como SOX2 e OCT-4, e com padrão de reexpressão tumoral semelhante vem sendo especulada e estudada.

Com o intuito de avaliar e aprofundar a associação de ID4 com outros fatores de transcrição presentes em células-tronco ou progenitoras e reexpressos em tumores; e com o objetivo de propor um papel para esses fatores na formação de astrocitomas e, conseqüentemente, uma alternativa

de tratamento, este estudo realizou a análise de *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133*, da coexpressão destes entre si e da correlação dos dados com as informações clínicas dos pacientes.

1.1. REVISÃO DA LITERATURA

As proteínas ID pertencem à família hélice-alça-hélice básica (*basic helix-loop-helix*, bHLH) de fatores de transcrição, consistindo em quatro membros: ID1, ID2, ID3 e ID4. Descritas pela primeira vez em 1990^[1,2], IDs demonstraram exercer papéis importantes em processos cruciais como desenvolvimento, controle do ciclo celular, angiogênese e tumorigênese.

1.1.1. ESTRUTURA DE IDs

O que caracteriza as proteínas ID como membros da família bHLH é a presença de uma estrutura composta de duas α -hélices anfipáticas, cada qual com 15-20 aminoácidos, conectadas por uma alça, de comprimento e sequência variáveis, como demonstra a Figura 1. No entanto, seus genes codificantes não são homólogos, estando cada qual em um cromossomo diferente^[3].

Figura 1: Estrutura proteica de ID1-4, com ênfase no domínio comum hélice –alça-hélice (*helix-loop-helix*, HLH). ID, *inhibitor of DNA binding*.

A Tabela 1 resume as diferenças estruturais dos genes e proteínas ID.

Tabela 1. Resumo das diferenças estruturais dos genes *ID*

	ID1	ID2	ID3	ID4
Cromossomo	20	2	1	6
Localização cromossômica	20q11.21	2p25.1	1p36.12	6p22.3
Número de acesso (NCBI)	NM_002165.3 (isoforma A) NM_181353.2 (isoforma B)	NM_002166.4	NM_002167.4	NM_001546.3
Isoformas	ID-A (isoforma A, canônica) ID-B (isoforma B)*	Não	rs11574 (T105A) rs11542317 (S111A)	Não
Exons	2 (isoforma A) 1 (isoforma B)	3	3	3
Aminoácidos	155	134	119	161
Domínios	66-106 → HLH 98-111 → sinal de exportação nuclear	36-76 → HLH 106-115 → sinal de exportação nuclear	41-81 → HLH	65-105 → HLH 39-48 → Poli A 118-124 → Poli P
Modificações pós-traducionais	K20 → ubiquitinação K23 → ubiquitinação S36 → fosforilação K77 → ubiquitinação K91 → ubiquitinação S111 → fosforilação	S5 → fosforilação K12 → ubiquitinação Y43 → fosforilação S44 → fosforilação	K2 → acetilação S5 → fosforilação Y11 → fosforilação S18 → fosforilação S21 → fosforilação	S5 → fosforilação

* Isoforma B de ID1: É resultante de *splicing* alternativo. Difere nos aminoácidos 143-155. Essa isoforma contém um segmento alternativo, que causa um *frameshift*. A isoforma B é mais curta e possui uma região C-terminal diferente da isoforma A.

**A, alanina; K, lisina; P, prolina; S, serina; T, treonina Y, tirosina.

HLH, domínio hélice-alça-hélice (*helix-loop-helix*).

A superfamília bHLH, em humanos, pode ser dividida em 6 classes, com base em critérios funcionais e bioquímicos (Tabela 2). Em comum, todas as proteínas apresentam a região HLH altamente conservada, sendo ela responsável pela homo/heterodimerização necessária para o desempenho do papel transcricional exercido pelos membros da família bHLH^[4-7].

Tabela 2. Classificação dos fatores de transcrição da família bHLH

Classe	Descrição
Classe I	proteínas que se ligam a domínios E (<i>E boxes</i>) de sequência CACCTG e CAGCTG, também conhecidas como proteínas E
Classe II	proteínas que se ligam a sequências CACGTG e CATGTTG
Classe III	proteínas que contêm um motivo de dimerização PAS adicional e se ligam a sequências ACGTG ou GCGTG
Classe IV	proteínas que não possuem o domínio básico de ligação ao DNA
Classe V	aquelas que se ligam ao domínios N (<i>N boxes</i>) de sequência CACGCG ou CACGAG e contêm: um domínio <i>Orange</i> , envolvido no aumento e melhora da dimerização; e um motivo c-terminal WRPW, necessário para o recrutamento de repressores
Classe VI	proteínas que contêm um domínio COE adicional, também envolvido no processo de dimerização e de ligação do DNA

PAS, *period circadian protein*, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein* e *single-minded protein*.

COE, domínio básico de ligação do DNA com uma prolina a mais.

Os membros da família bHLH funcionam como dímeros obrigatórios na regulação da transcrição. Eles se ligam ao DNA como dímeros através de seus domínios específicos de ligação do DNA. Um exemplo desse mecanismo são as proteínas E, que se ligam a outras proteínas bHLH para iniciar a transcrição de genes-alvo. Em contraste, as proteínas ID, da classe IV da família da bHLH, que não possuem um domínio de ligação do DNA, associam-se a proteínas parceiras (membros da família bHLH ou outras proteínas) e impedem que estas formem dímeros com proteínas de ligação do DNA^[8,9], como demonstra a Figura 2.

Figura 2: Comparação da estrutura proteica de outros membros da família HLH com a estrutura proteica de ID. ID apresentam ausência de um domínio de ligação ao DNA. b, *basic*.

Uma vez que a maioria das proteínas bHLH ligantes de ID regula positivamente vários genes durante a determinação do destino da célula e da diferenciação celular, o nome “ID” convenientemente faz alusão à

habilidade dessas proteínas de inibir tanto a ligação do DNA como a diferenciação^[4].

1.1.2. ATIVAÇÃO DOS GENES ID

O principal modelo da ativação da transcrição de *IDs* é o da sinalização das proteínas morfogenéticas ósseas (*Bone Morphogenetic Proteins* – BMPs) através da via das SMADs (*Mothers Against Decapentaplegic homolog 1*)^[10–12].

BMPs, que fazem parte da superfamília de ligantes TGF- β (*transforming growth factor β*), ligam-se a dois tipos de receptores: tipo I (ALK1-7, *activin receptor-like kinase 1-7*) e tipo II (BMPRII, *bone morphogenetic protein receptor II*; ActRII, *activin receptor II*; ActRIIB, *activin receptor IIB*), ambos serina/treonina quinases. Ambos os receptores, na forma de dímeros, são necessários para a transdução do sinal de BMP. As BMPs podem ligar-se a um homodímero tipo I na ausência de receptores do tipo II; no entanto, a afinidade é muito fraca. Quando há formação do complexo heterodimérico tipo I/II, a afinidade de BMPs aumenta drasticamente. Após a ligação de BMP, a quinase serina/treonina constitutivamente ativa do receptor tipo II fosforila o receptor tipo I. O receptor tipo I ativo fosforila substratos específicos das SMADs Reguladoras (R-SMADs), que formam complexos heterodiméricos com SMADs mediadoras comuns (Co-SMADs). Os complexos formados translocam-se para o núcleo. Já no núcleo, esses complexos podem se ligar diretamente, ou através de parceiros, a sequências específicas (CAGC) da região promotora dos genes-alvo de BMP e, assim, regular a transcrição^[13–15]. A Figura 3 exhibe os tipos de BMPs, seus respectivos receptores tipo I e II, e as SMADs ativadas.

Figura 3: BMPs, seus receptores e SMADs ativadas. BMP, *Bone Morphogenetic Proteins*; GDF, *growth differentiation factor*; BMPRII, *bone morphogenetic protein receptor II*; ActRII, *activin receptor II*; ActRIIB, *activin receptor IIB*; ALK-1, *activin A receptor type II-like 1*; ALK-2, *activin A receptor, type I*; SMADs (*Mothers Against Decapentaplegic homolog 1*).

Diversos estudos demonstraram que a ligação de BMP2, BMP4 e BMP7 está relacionada com a ativação de *ID*s. Ao se ligar ao complexo de receptores I e II, essas BMPs levam ao recrutamento das SMAD1,5 (R-SMADs), que subsequentemente formam um complexo com SMAD4 (Co-SMAD)^[16–21]. Esse complexo se transloca para o núcleo e, juntamente com outros cofatores de transcrição, como p300 (*E1A binding protein p300*) ou SRC (*v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)*), acopla-se à região promotora dos genes de *ID*, que possui um elemento de ligação de SMADs (*SMAD Binding Element – SBE*), iniciando sua transcrição, como demonstra a Figura 4.

Figura 4: Regulação da transcrição dos genes *ID*. A ligação de BMP-2,4,7 a um complexo de receptores tipo I e II leva à ativação de Smad reguladoras (1,5) e de Smad mediadora comum (4). Ocorre ligação dessas Smads e translocação para o núcleo. Juntamente com cofatores de transcrição (p300), há o início da transcrição dos genes *ID1-4*.

Outras moléculas foram identificadas como ativadores diretos dos genes *ID*, como é o caso de BCL-3 (*B-cell CLL/lymphoma 3*)^[22] e FGF2 (*fibroblastic growth fator 2*)^[23], funcionando como uma via não-canônica. Existem outras vias e proteínas que ativam especificamente um ou mais genes *ID*, como demonstra a Tabela 3.

Tabela 3. Ativadores da transcrição dos genes *ID*

Gene/via ativador	Nome do gene ativador	Gene <i>ID</i>	Referência
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	<i>ID1/ID3</i>	[24]
PGE(2)	<i>COX-2-derived prostaglandin</i>	<i>ID1</i>	[25]
AR	<i>Androgen receptor</i>	<i>ID1</i>	[26]
PI3K/AKT		<i>ID1</i>	[27]
Abi1	<i>Abelson interector 1</i>	<i>ID1</i>	[28]
MEK1	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	<i>ID2</i>	[29]
FSH	<i>Folicle stimulating hormone</i>	<i>ID2</i>	[30]
Myc	<i>Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	<i>ID2</i>	[31]
β-catenin	<i>Beta catenin</i>	<i>ID2</i>	[32]
EGFR	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>	<i>ID3</i>	[33,34]
12/15LO	<i>12/15 lipoxygenase</i>	<i>ID3</i>	[35]
MAPK/EgR	<i>mitogen-activated protein kinase 1 / early growth response 1</i>	<i>ID3</i>	[36]

Gene/via ativador	Nome do gene ativador	Gene ID	Referência
TP53 mutado	<i>Tumor protein 53</i>	ID4	[37,38]
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i>	ID4	[39]
BRCA1	<i>Breast and ovarian cancer susceptibility protein 1</i>	ID4	[40]
Notch1/RBPJ	<i>Neurogenic locus, notch homolog protein 1 / J-kappa-recombination signal-binding protein</i>	ID4	[41]

Interessantemente, a regulação negativa dos IDs é feita principalmente pela própria proteína TGF- β , através de um de seus repressores transcricionais, ATF3 (*activating transcription factor 3*)^[42]. Após ativação do gene de ATF3 por TGF- β , este forma um complexo com a SMAD3 repressora, e juntos inibem diretamente a transcrição dos genes ID.

As proteínas ID possuem uma meia-vida curta, com cerca de 20-60 minutos, e tornam-se estáveis apenas através da dimerização^[43]. A degradação se dá por meio de proteólise via ubiquitinação no proteossomo 26S, à exceção de ID4, que não é degradada no proteossomo, mas sim por uma via alternativa ainda não esclarecida^[44]. Foram identificadas proteínas responsáveis pela ubiquitinação de IDs, como a proteína induzida por interferon, p204^[45,46], e o complexo proteico ubiquamente expresso APC/CDH1(*adenomatous polyposis coli/cadherin 1, type 1, E-cadherin*)^[47,48]. Este último reconhece um motivo de destruição (*Destruction box, Dbox*) altamente conservado, localizado na região C-terminal do domínio HLH de IDs.

1.1.3. FUNÇÃO

Uma vez produzidas, as proteínas ID estão envolvidas em uma série de processos biológicos, como o desenvolvimento embrionário, o controle do ciclo celular e a angiogênese.

1.1.3.1. Desenvolvimento embrionário

IDs têm sido apontados como alvos importantes durante o desenvolvimento, aparecendo como figuras cruciais no processo de proliferação e crescimento, bem como mantendo o perfil indiferenciado das células.

Todas as quatro proteínas ID encontram-se expressas durante o desenvolvimento embrionário, sendo observadas em regiões diferentes e em momentos distintos. A distribuição de ID1-3 possui sobreposição, diferentemente de ID4, que apresenta um padrão único^[49–52].

Foram realizados experimentos com camundongos *knock-out* para cada gene ID (revisado em^[8]), identificando seus efeitos. Foram detectados defeitos na migração de linfócitos T (*ID1*^{-/-}); 25% de mortalidade perinatal (*ID2*^{-/-}); defeitos na imunidade humoral e na proliferação de linfócitos T (*ID3*^{-/-}); e diferenciação prematura e proliferação defeituosa em células neurais (*ID4*^{-/-}). No entanto, o *knock-out* duplo *ID1*^{-/-}/*ID3*^{-/-} foi o fenótipo que apresentou maior letalidade^[53]. Os camundongos com esse fenótipo apresentaram malformações cerebrais, vasculares e endoteliais, com presença de hemorragias e defeitos cardíacos.

1.1.3.2. Ciclo celular e proliferação

O mecanismo de ação das proteínas ID no controle do ciclo celular é semelhante entre os membros. Ao exercerem seu papel de reguladores negativos da transcrição, IDs impedem a transcrição de moléculas responsáveis pela manutenção das células na fase G1/G0 do ciclo celular, estimulando, assim, a proliferação.

Um exemplo desse mecanismo está na associação de ID2 à proteína retinoblastoma (Rb), uma molécula crucial para a transição G1 – S^[31,54,55] (Figura 5). A forma ativa de Rb se liga às suas moléculas-alvo (por exemplo, E2F, *E2F transcription factor 1*), impedindo que estas ativem a transcrição de genes responsáveis pela entrada na fase S do ciclo celular. A expressão de genes como *MYC* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*) ou outros mitógenos leva ao aumento de IDs (principalmente ID2). Assim, a expressão de ID2 ultrapassa a de Rb, ocorrendo ligação entre as

duas proteínas e a subsequente inibição das atividades supressoras do crescimento, mediadas por Rb. Juntamente, a hiperexpressão de ID1 leva à regulação negativa de $p16^{INK4A}$ (*CDKN2A*, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) através da ligação desta às proteínas da família Ets (*E-twenty six*), responsáveis pela transcrição deste gene. $p16^{INK4A}$ mantém o status ativo de Rb. Assim, sem níveis suficientes de $p16^{INK4A}$, ocorre inativação de Rb por fosforilação^[56].

Figura 5: Papel de ID1 e ID2 na repressão da proteína retinoblastoma (RB). A hiperexpressão de ID2, induzida por MYC, suprime a expressão de RB, impedindo que essa controle a transcrição de genes responsáveis pela proliferação. Juntamente, a hiperexpressão de ID1 leva à regulação negativa de $p16^{INK4A}$ através da ligação desta às proteínas Ets, responsáveis pela transcrição deste gene. $p16^{INK4A}$ mantém o status ativo de Rb. Assim, sem níveis suficientes de $p16^{INK4A}$, ocorre inativação de Rb por fosforilação.

Há também um envolvimento das proteínas Ids na regulação de proteínas inibitórias de CDK (*cyclin-dependent kinase*), como $p21$ (*CDKN1A*, *cyclin-dependent kinase inhibitor*^[57]). O gene *p21* tem sua transcrição controlada por proteínas pertencentes à família bHLH, como MyoD1 (*myogenic differentiation 1*) e as proteínas E. Quando na presença de ID1, os níveis de RNA mensageiro (mRNA) de *p21* decaem, levando à progressão para a fase S do ciclo celular e consequente aumento na proliferação celular. Como esse mecanismo, que envolve a inibição da ação

de proteínas bHLH, é comum a todas as proteínas IDs, é possível que esse processo não seja exclusivo de ID1^[4].

Outra CDK inibitória, p27^{kip1} (*interferon, alpha-inducible protein 27*), também demonstrou ter sua regulação negativa governada por IDs^[58]. Nesse caso, ID3 é a molécula responsável, e exerce sua função inibitória ao se ligar ao fator de transcrição e ativador de p27^{kip1}, ELK1 (membro da família *E-twenty six*). Ocorre progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular e as células entram em processo de proliferação.

Durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), ID4 tem um papel crucial na regulação do ciclo celular. Ao se ligar a proteínas como NEUROD1 (*neurogenic differentiation 1*), responsável pela ativação de genes de diferenciação celular (como *NGN1, neurogenin 1*), ID4 impede essa diferenciação, ao mesmo tempo em que estimula a proliferação, induzindo a entrada na fase S do ciclo celular^[59].

1.1.3.3. Angiogênese

O processo de formação de vasos a partir da vasculatura pré-existente (angiogênese) mostrou ter participação ativa das proteínas IDs. Em experimento realizado com células vasculares-endoteliais de cordão umbilical humano^[60], a hiperexpressão dos genes *ID1* e *ID3* foi suficiente para a ativação do processo angiogênico, mesmo na ausência de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), uma molécula altamente angiogênica. Além disso, a inativação de ID1 e ID3 por *knock-down* levou a uma drástica diminuição no potencial angiogênico dessas células.

A expressão aumentada do mRNA de *ID1* também foi detectada em células progenitoras endoteliais provenientes da medula-óssea. Estudos *in vitro* e *in vivo* comprovaram ser ID1 crucial para a manutenção desse fenótipo e o funcionamento da célula^[61]. Um exemplo desse papel seria a diminuição em um terço no número de células progenitoras endoteliais circulantes em camundongos devido a *knock-down* de *ID1*. A expressão ectópica de ID1 foi demonstrada como ativadora de células endoteliais, bem

como a responsável por mediar os efeitos angiogênicos decorrentes da sinalização de BMPs^[62].

Em outro estudo utilizando células vasculares-endoteliais de cordão umbilical humano e linhagem tumoral de glioblastoma^[33], a hiperexpressão de ID3 levou a um aumento na produção de citocinas angiogênicas (CXCL1, *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*); IL6, *interleukin 6*; e IL8; *interleukin 8*), e à consequente formação de vasos *in vitro*.

Já o aumento da expressão de *ID4* em linhagens de glioblastoma (U251 e U87), e a posterior injeção subcutânea dessas células em camundongos *knock-out*, levou a uma maior proliferação de células endoteliais, e à formação de vasos maiores e em maior número quando comparados a seus controles^[63].

1.1.3.4. Tumorigênese

Análise dos níveis proteicos e de RNAm de IDs em diversos tipos tumorais (tumores do SNC, carcinomas de colón, mama, ovário, pâncreas, endométrio, melanomas, leucemia) já foram realizados, com resultados de hiperexpressão. Essa hiperexpressão dos genes *ID* encontra-se associada ao grau de gravidade da doença e um pior prognóstico. Abaixo, uma revisão do papel de cada ID na tumorigênese.

1.1.3.4.1. *ID1*

Em carcinoma de mama, ID1 atua como um regulador negativo de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), um importante supressor tumoral. Isso ocorre por meio de hiporregulação de p53 (*tumor protein 53*), responsável pela ativação de PTEN, mediada por ID1^[64]. Baixos níveis de PTEN aumentam a ativação da via de sinalização PI3K/AKT (*phosphatidylinositol-3-phosphate/ v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*), cujos níveis anormais estão associados ao crescimento exacerbado e à migração em tumores.

Também em estudos com carcinoma de mama, ID1 foi considerado um fator de pior prognóstico, com significativa diminuição tanto no tempo de

sobrevida, como no tempo livre de doença das pacientes^[65]. Em carcinoma de ovário, ID1 também foi considerado um fator de pior prognóstico clínico^[66]. Além disso, seu silenciamento gênico levou a uma diminuição de metástases pulmonares de células provenientes de carcinoma de mama^[67].

ID1 está associado ao crescimento tumoral em amostras de carcinoma oral de células escamosas^[68]. Nesse mesmo estudo, foi demonstrada uma associação entre o aumento na expressão de ID1 com o potencial angiogênico desses tumores, bem como com a progressão e a agressividade tumoral.

Em glioblastoma, a hiperexpressão de ID1 foi identificada em células-tronco cancerosas, em nichos específicos desse tumor sólido^[69]. Em conjunto com altos níveis de CD44 (*CD44 protein*) nessas mesmas células, ID1 foi identificado como um fator de pior prognóstico e menor sobrevida nos pacientes.

1.1.3.4.2. ID2

A hiperexpressão da proteína ID2 é um fator preditivo de um pior prognóstico nos casos de neuroblastoma em crianças, independentemente de outras variáveis clínicas ou biológicas^[70]. E o aumento dos níveis de mRNA de ID2, governado pelo fator de transcrição HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*), em neuroblastomas com regiões hipóxicas, resulta em um fenótipo pior e menos diferenciado^[71].

Em linhagens de carcinoma de mama, a expressão aberrante de ID2 tem efeitos no aumento da proliferação celular, na migração e invasão *in vitro*^[72].

A hiperexpressão de ID2 foi identificada em linhagens de melanoma, carcinoma de próstata e bexiga, principalmente naquelas com alto potencial metastático, quando comparadas a seus pares de menor potencial^[73]. Além disso, ID2 mostrou ser um inibidor da semaforina-3F, um potente inibidor de metástases.

1.1.3.4.3. *ID3*

O adenocarcinoma pancreático ductal advém de células ductais quiescentes. A hiperexpressão de *ID3* leva a uma diminuição da ação do fator de transcrição E47 (*TCF3, transcription factor 3*), membro da família bHLH (Classe I), e leva à entrada das células no ciclo celular, aumentando a proliferação^[74].

Em experimentos *in vivo* utilizando inoculação subcutânea de células de carcinoma de pulmão de células pequenas, o silenciamento de *ID3* levou ao surgimento de tumores menores em comparação a seus controles^[75].

Células pancreáticas malignas tiveram as habilidades de migração, proliferação e adesão à laminina diminuídas quando foi realizado o *knock-down* duplo de *ID1* e *ID3*^[76].

A indução de *ID3* e sua consequente hiperexpressão em linhagens de glioblastoma através da via EGFR/AKT/SMAD5 (*epithelial growth factor receptor*) leva à formação de “oncosferas”, células flutuantes em cultura contendo células-tronco cancerosas. *ID3* demonstrou ser crucial para a manutenção do fenótipo indiferenciado dessas células, e de seu potencial proliferativo e angiogênico^[33,34].

1.1.3.4.4. *ID4*

Em estudo utilizando linhagens de carcinoma de mama, foi comprovada a associação direta da proteína p53 mutada e o aumento na expressão de *ID4*, conduzindo a um aumento na angiogênese pela expressão de citocinas específicas (*IL8, interleukin 8; CXCL1, chemokine (C-X-C motif) ligand 1*)^[37,38]. Ficou demonstrado também que, além de induzir sua expressão, *ID4* estabiliza essas citocinas por interação com suas regiões 3' não traduzida (3'UTR).

Astrócitos murinos *Ink4a/Arf*^{-/-} sofreram transformação maligna após tratamento, resultando na hiperexpressão de *ID4*^[77]. Os experimentos *in vivo* levaram à formação de gliomas de alto grau, de acordo com a análise clínica e histológica.

A indução da expressão de *SOX2* (*SRY (sex determining region Y)-box 2*) por ID4, através da supressão da expressão do microRNA-9* (*mir9**), em células de glioma e células-tronco de glioma, levou à quimiorresistência dessas células, bem como à aquisição e manutenção de um fenótipo típico de células-tronco cancerosas^[78]. A Figura 6 resume os papéis já descritos exercidos por ID4 na tumorigênese.

Figura 6: ID4 na tumorigênese. A indução exacerbada da transcrição de *ID4* pela proteína mutada p53 (*mutp53*) leva ao aumento de sua proteína, que, por sua vez, confere aumento à expressão de citocinas angiogênicas (*IL8*, interleucina 8; *CXCL1*, *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*) e de *SOX2*, fator de transcrição relacionado com a quimiorresistência de glioblastomas.

1.1.4. LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DAS PROTEÍNAS IDs

A atividade das proteínas IDs é dependente de sua subcompartimentalização celular, como acontece com outros fatores de transcrição. O sequestro de IDs no citoplasma por proteínas ligadas ao citoesqueleto^[79–81], ou pela proteína p204^[45], por exemplo, impede as proteínas IDs de exercerem seu papel como reguladoras negativas da transcrição através da dimerização com proteínas alvo no núcleo (Figura 7).

Figura 7: A localização subcelular de IDs influencia em sua ação. Quando mantidas no citoplasma por ligação a proteínas do citoesqueleto (p204, PC2, ENH), a transcrição de genes controladores do ciclo celular ocorre normalmente, uma característica de células estáveis e diferenciadas. No entanto, em células com altos índices de proliferação, como as células tumorais, há uma concentração de proteínas ID no núcleo, regulando negativamente a transcrição de genes controladores do ciclo celular e aumentando a proliferação. PC2, *polycystic kidney disease 2*; ENH, também denominado PDLIM5, *PDZ and LIM domain 5*.

A distribuição tecidual de ID1-3 apresenta sobreposição, sendo que as três proteínas são encontradas em uma gama diferente de linhagens teciduais, como mioblastos, linfócitos B e T, precursores osteogênicos, timócitos, células endoteliais, epiteliais e da medula óssea (revisado em ^[6,8]). Diferentemente, ID4 apresenta um padrão único, com expressão tardia e predominância no SNC^[82]. Por essa razão, o presente estudo focará a análise das funções de ID4 e seus parceiros no SNC.

1.1.5. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

1.1.5.1. ID4

Em camundongos, a inativação do gene de ID4 resulta em defeitos no crescimento, bem como letalidade embrionária e pós-natal. Camundongos mutantes adultos *ID4*^{-/-} exibem alterações drásticas na morfologia do cérebro: diminuição em neurônios e em glia, redução no tamanho cerebral e ventrículos anormalmente aumentados. Essa diminuição em células neuronais e da glia se dá por uma diminuição prévia das células precursoras neurais e por defeitos na diferenciação dessas células. Esse fenômeno foi atribuído a um aumento no período da fase G1 do ciclo celular, uma vez que ID4 se liga a fatores de transcrição bHLH responsáveis pela diferenciação (como *NGN1*, *neurogenin 1*) e promove a transição G1-S^[49,59,83]. Esses achados postulam a expressão apropriada de ID4 como sendo crítica para o desenvolvimento correto do SNC, regulando a proliferação e a diferenciação das células precursoras neurais.

ID4 também é responsável, durante o desenvolvimento cerebral, pela mediação dos efeitos inibitórios exercidos por BMP4 na diferenciação oligodendroglial, levando a uma consequente diferenciação astrocitária^[84].

No cérebro adulto, ID4 encontra-se expressa em neuroblastos em proliferação durante o início da neurogênese, e continua expressa em células neuronais e gliais diferenciadas, ainda que em níveis mais baixos^[70,85,86].

Outros fatores de transcrição também são essenciais para a manutenção do fenótipo indiferenciado das células progenitoras neurais e o correto desenvolvimento cerebral, como SOX2, OCT-4 (*octamer binding protein 4*), NANOG (*Nanog homeobox*) e CD133 (*prominin 1*).

1.1.5.2. SOX2

SOX2 é um membro da superfamília SRY de fatores de transcrição que possuem um domínio de ligação do DNA contendo um grupo de alta mobilidade (*high mobility group*, HMG)^[87]. É responsável pela regulação da transcrição e da arquitetura da cromatina. Sua ativação é governada pelo fator de transcrição OCT-4, que forma um complexo com a própria proteína

SOX2, num mecanismo de autorregulação positiva. É um dos primeiros fatores a ser expresso durante o desenvolvimento do cérebro, presente em células-tronco e células progenitoras neurais, tanto embrionárias quanto adultas^[88].

A importância de SOX2 para o início do desenvolvimento neural foi atestada ao se verificar que camundongos mutantes *SOX2*^{-/-} são embrionicamente inviáveis^[89]. Foi proposto um modelo de via de manutenção do estado indiferenciado das células-tronco neurais envolvendo ativação de SOX2 pela cascata de sinalização de *Sonic Hedgehog* (SHH)^[90].

Tanto o mecanismo de autorregulação positiva, como a via de ativação por SHH são tidas como vias canônicas de ativação de SOX2. Alterações nessas vias têm sido apontadas como responsáveis pelo desenvolvimento de certos tipos de câncer^[91], como é o caso da formação do complexo OCT-4/SOX4 em células-tronco de gliomas^[92].

1.1.5.3. OCT-4

A proteína OCT-4 (também conhecida como POU5F1, *POU class 5 homeobox 5*) é um fator de transcrição que se liga ao DNA através de dois domínios POU. Essa ligação pode tanto ativar como reprimir a transcrição de determinados genes, o que varia de acordo com o papel crucial que OCT-4 exerce no controle da pluripotência celular e com o momento da diferenciação, sendo essa proteína postulada como “mestre da pluripotência”^[93,94]. OCT-4 age cooperativamente com SOX2 na ativação da transcrição, formando um complexo. Isso se deve ao fato de que seus sítios específicos de ligação ao DNA encontram-se adjacentes nos genes-alvo^[87,95,96].

A hiporregulação de OCT-4 durante o processo de diferenciação das células-tronco embrionárias humanas em células progenitoras neurais é progressiva, e ocorre concomitantemente ao aumento de marcadores neurais. A relação entre OCT-4 e os marcadores neurais está inversamente correlacionada, e um total comprometimento das células-tronco pluripotentes

com a linhagem neural só pode acontecer após repressão completa de OCT-4. Em contraste, a expressão de SOX2 mantém-se alta durante esse processo, bem como nas células progenitoras neurais. Dessa forma, OCT-4 não age diretamente na diferenciação neural, mas governa a pluripotência das células envolvidas no processo^[97]. Já SOX2 exerce um papel crucial na manutenção de células progenitoras neurais^[98].

1.1.5.4. *NANOG*

Nanog também funciona como um fator de transcrição e é caracterizado por possuir um homeodomínio. Sua descoberta ocorreu quando foi observada a sua alta expressão em células tronco embrionárias, onde é responsável por manter a autorrenovação dessas células, bem como a pluripotência e bloquear a diferenciação. Embriões deficientes em NANOG não conseguem manter o estado de pluripotência das células tronco até o momento correto da diferenciação^[99–102]. Sua ativação transcricional se dá por uma ação do complexo OCT-4/SOX2^[103]. Assim como OCT-4, durante o desenvolvimento neural, a expressão de NANOG decai, dando lugar aos marcadores específicos do tecido^[97].

1.1.5.5. *CD133*

Primeiro membro descrito da família das promininas, CD133 é uma proteína transmembrânica associada com a organização da topologia da membrana plasmática^[104,105]. Primeiramente identificado em células progenitoras hematopoiéticas^[106], CD133 logo foi descrito como um marcador de células-tronco em outros tecidos, incluindo cérebro normal^[104,107,108] e tumores cerebrais^[109–111].

Conclui-se, portanto, que as atividades de *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133* coincidem com períodos de proliferação maciça associada à embriogênese normal, e potencialmente poderiam estar associadas à proliferação maligna.

1.1.6. TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são raros, sendo a incidência mundial de tumores cerebrais primários cerca de 7 indivíduos a cada 100.000 habitantes por ano, o que representa aproximadamente 2% do total dos tumores primários^[112]. Eles representam um grupo bastante heterogêneo de neoplasias originárias de tecidos intracranianos e meninges com quatro graus de malignidade de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Variam em relação ao tecido de origem quanto à localização, padrão de disseminação, quadro clínico, história natural, idade de ocorrência e prognóstico^[113]. Ainda que raros, esses tumores são extremamente agressivos, sendo que apenas 3 a cada 100 indivíduos sobrevivem 5 anos após diagnóstico. A OMS reconhece mais de 120 formas de tumores do SNC^[114]. Entre estes, os mais comuns são os meningiomas e os gliomas.

Gliomas são um grupo heterogêneo de tumores primários neuroectodermais, que se originam de células gliais, como astrócitos e oligodendrócitos, ou de suas células progenitoras. Os gliomas mais comuns são os astrocitomas, os oligodendrogliomas, os gliomas mistos (oligoastrocitomas), e os ependimomas. Os astrocitomas dividem-se em diferentes graus de malignidade, segundo a OMS, e representam os gliomas mais frequentes (Figura 8)^[115,116].

Figura 8: Distribuição dos gliomas quanto ao subtipo histológico. De um total de 89.617 casos reportados nos EUA no período de 2004-2008, nota-se que os astrocitomas representam 77% dos casos de glioma^[117].

1.1.6.1. Astrocitomas

Os astrocitomas apresentam níveis crescentes de malignidade que variam de I a IV segundo a OMS, sendo o último mais agressivo e com pior prognóstico. Os critérios de malignidade são definidos pela presença de indicadores como neovascularização, mitoses, atipia nuclear e necrose. A gradação tumoral é determinada pelo número de critérios, sendo que o astrocitoma grau I não apresenta características infiltrativas e, portanto, de malignidade; o grau II apresenta 1 critério de malignidade, geralmente atipia nuclear; o grau III apresenta 2 critérios, geralmente atipia nuclear e mitoses; e o grau IV apresenta 2 ou 3 critérios, atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e/ou necrose. Adicionalmente, os astrocitomas do grau II a IV são denominados astrocitomas difusamente infiltrativos, por suas características infiltrativas^[114].

1.1.6.1.1. Astrocitoma pilocítico

Os astrocitomas pilocíticos são classificados como grau I pela OMS. Ocorrem principalmente no cerebelo de crianças^[113]. Ao contrário dos demais astrocitomas, apresentam-se circunscritos e com crescimento lento, podendo permanecer em grau I por anos e até décadas, o que mostra seu

caráter menos maligno. Se a ressecção cirúrgica for possível, pacientes com esse tumor apresentam bom prognóstico^[117].

Histologicamente são caracterizados por baixa ou moderada celularidade, por um padrão bifásico com proporção variada de células bipolares compactadas com presença de fibras de Rosenthal e células soltas de estruturas multipolares com microcistos e corpos granulares^[114]. Proliferação vascular, proliferação celular, pleomorfismo, necrose não em paliçada e alguma atividade mitótica, ainda são consistentes com esse diagnóstico. Contudo, casos raros mostram alta atividade mitótica e necrose com formação em paliçada, que indicam comportamento de um tumor mais agressivo, sendo então classificado como astrocitoma pilocítico anaplásico^[118].

A maioria desses tumores se desenvolve no cerebelo, e representam 10% dos astrocitomas cerebrais e 85% dos cerebelares. Outras regiões típicas incluem estruturas como o nervo óptico e quiasma óptico, hipotálamo, tálamo, gânglios da base e tronco cerebral. Entretanto, astrocitomas pilocíticos também podem ser encontrados nos hemisférios cerebrais ou na medula espinhal. Macroscopicamente essas neoplasias apresentam-se como maleáveis, acizentadas e, freqüentemente, com lesões císticas^[118].

1.1.6.1.2. Astrocitomas difusamente infiltrativos

Os astrocitomas difusamente infiltrativos, de grau II-IV, são os mais comuns em adultos. Ao contrário do astrocitoma pilocítico, eles invadem o tecido encefálico normal, dificultando a ressecção cirúrgica e, portanto, apresentando pior prognóstico^[113]. Os astrocitomas de grau II e III podem progredir para grau IV^[112], processo este de muita relevância clínica, já que pacientes com astrocitoma difuso (grau II) tem sobrevida média de 7 anos, tempo que cai pela metade em pacientes com astrocitoma anaplásico (grau III) e, no caso de pacientes com glioblastoma (grau IV), é menor que 12 meses^[113].

Os astrocitomas difusos de baixo grau (AGII) são tumores bem diferenciados, que afetam adultos e podem estar localizados em qualquer

região do SNC, mas preferencialmente nos hemisférios cerebrais. Os astrocitomas de baixo grau são predominantes no gênero masculino, afetam freqüentemente adultos jovens, com um pico na terceira década de vida, entre 30 e 40 anos^[114]. De pacientes com recidiva tumoral de AGII, a segunda amostra cirúrgica freqüentemente mostra características de astrocitoma anaplásico, como hiper Cromasia, aumento de atipia nuclear, atividade mitótica, e, eventualmente, características de glioblastoma, como proliferação microvascular e/ou necrose. A progressão para a anaplasia é imprevisível, assim como o tempo que estas mudanças levam para ocorrer.

Astrocitomas anaplásicos (AGIII) são caracterizados pelo aumento na proliferação e atipia celular, caminhando mais rapidamente para a letalidade. Os astrocitomas anaplásicos acometem preferencialmente homens adultos com idade média de 41 anos, apresentam anaplasia focal ou dispersa e um grande potencial proliferativo. Sua localização é semelhante a dos astrocitomas de baixo grau, com preferência pelos hemisférios cerebrais^[114]. Esses tumores se originam da progressão de um astrocitoma de baixo grau, e, em um intervalo médio de aproximadamente 2 anos, possuem uma tendência intrínseca a progredirem para glioblastomas^[119]. Assim, dos pontos de vista clínico, morfológico e genético, pode-se considerar que o astrocitoma anaplásico constitui um estágio intermediário na rota de progressão para um GBM. Devido a uma variação considerável no período de latência e a rapidez com que esses tumores progridem, há a necessidade de marcadores prognósticos adicionais.

Finalmente, astrocitomas de grau IV, denominados glioblastomas (GBM), são os mais agressivos, mais malignos e mais frequentes, exibindo proliferação vascular, necrose e resistência ao tratamento radioterápico e quimioterápico. GBMs ocorrem mais freqüentemente na substância branca dos hemisférios cerebrais e podem se manifestar em qualquer idade, mas afetam preferencialmente homens adultos entre 45 e 70 anos de idade. Os GBMs podem originar-se *de novo* (GBM primários), o que ocorre na maioria dos casos, ou através da malignização de tumores pré-existentes (GBM secundários)^[120]. Os glioblastomas primários são mais freqüentes em

peessoas com mais idade (idade média de 55 anos). Após uma história clínica muito curta, normalmente menos de 3 meses, estes tumores se manifestam de novo, ou seja, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica da existência de uma lesão menos maligna anterior. Este tipo de glioblastoma parece ser resistente à radioterapia, com lesões altamente infiltrativas e, deste modo, tem um pior prognóstico. Já os glioblastomas secundários se desenvolvem tipicamente em pacientes mais jovens (idade média de 45 anos), através da progressão de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico. O tempo de evolução varia consideravelmente, com intervalos entre 1 ano ou mais de 10 anos^[120].

Apesar dos avanços na identificação dos mecanismos moleculares correspondentes à progressão de AGII para astrocitomas de graus mais elevados (III ou IV), como mostra a Figura 9, estes ainda não foram totalmente esclarecidos^[114,121–123].

Figura 9: Alterações moleculares já descritas na progressão dos astrocitomas. *EGFR*, *epithelial growth factor receptor*; *TP53*, *tumor protein 53*; *PTEN*, *phosphatase and tensin homolog*; *NF1*, *neurofibromin 1*; LOH, perda de heterozigosidade, *loss of heterozygosity*; *IDH1*, *isocitrate dehydrogenase 1*.

1.1.7. REEXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À EMBRIOGÊNESE EM TUMORES

Estudos demonstraram que o aumento na expressão de genes comumente expressos durante a embriogênese, relacionados à autorrenovação e ao estado indiferenciado das células, está associado a tumores com fenótipos mais agressivos e menos diferenciados. *SOX2*, *OCT-4* e *NANOG* e seus genes-alvo foram apontados como os principais

responsáveis por esse fenótipo, presente em diversos tipos de tumores (inclusive gliomas) e associados a um pior prognóstico^[111,124,125].

Estudos demonstraram que os membros da família ID também apresentam esse comportamento de reexpressão em tumores^[8]. Uma possível associação de *IDs* com os genes já estabelecidos como característicos do processo da diferenciação celular na embriogênes e com o processo tumorigênico atribuiria um novo papel e interesse a esse grupo de genes. Dessa forma, *ID4* surge como o candidato potencial para a verificação dessa possibilidade.

2.OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consiste no estudo da expressão gênica do gene *ID4* em amostras de astrocitomas humanos. Os objetivos específicos são:

- Análise da expressão gênica de *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133* em amostras de astrocitomas de diferentes graus de malignidade;
- Correlacionar os dados da expressão gênica de *ID4* com os dados de *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133*;
- Correlacionar o status mutacional de *TP53* com os dados de expressão gênica;
- Avaliar o impacto dos dados de expressão gênica na sobrevida dos pacientes com GBM.

3.METODOLOGIA

3.1. Extração de DNA e RNA

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

3.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição Reversa

A síntese de cDNA das amostras de tumor e controle foi realizada, partindo-se de 1µg de RNA total, utilizando enzima Superscript III (Life Technologies, Carlsbad, EUA), oligo dT e *random primers* (Life Technologies) e inibidor de RNase (RNaseOUT, Life Technologies). Foi realizada inicialmente uma digestão com 3U de DNase (Roche, Basel, Suíça) para eliminar possível contaminação com DNA genômico, seguida de denaturação do RNA e pareamento dos primers, transcrição reversa, e digestão com RNase H para degradar as fitas híbridas RNA:DNA. O cDNA foi diluído em TE (Tris/EDTA) na proporção 1:50 e utilizado para as reações de análise de expressão gênica por PCR (reação em cadeia por polimerase) quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

3.3. Desenho de *primers* para qRT-PCR

As sequências FASTA, correspondentes ao mRNA dos genes, foram obtidas através da base de dados *Gene*, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Com o propósito de se checar expressão gênica, os pares de *primers* foram desenhados de forma que o produto a ser amplificado estivesse no intervalo de pelo menos uma junção de éxon. Para obter a posição das bases das junções, recorreu-se ao *Blat*, ferramenta do *UCSC Genome Bioinformatics* (Kent Informatics, Santa Cruz, EUA). Além

deste, os critérios utilizados para desenho dos *primers* foram: I) maior proximidade da extremidade 3' do gene, evitando-se produtos com distância maior que 3.000 pares de bases (pb) da mesma; II) proporção CG em torno de 50% do total de bases; III) *primers* com tamanho entre 18-25bp; IV) temperatura de anelamento entre 58 e 60°C, com diferença preferencialmente até 1°C entre os pares; V) limite de 3 bases repetidas em sequência; VI) ausência de estruturas secundárias como “*hairpins*”, homo e heterodímeros; e VII) amplificação de um produto de tamanho entre 80-130pb. Todos estes critérios tiveram como objetivo garantir a eficiência e especificidade da reação. Para checagem de temperatura de anelamento, presença de estruturas secundárias e proporção CG, foi utilizado o programa *Primer Express 3.0*. Os *primers* desenhados tiveram sua especificidade checada pelo *Blat* ^[126] e *Blast-n*, do NCBI. As sequências de *primers* foram específicas para cada gene estudado (tiveram o mesmo RefSeq) e foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, EUA).

3.4. PCR Quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Amostras de cDNA da casuística foram testadas quanto aos níveis de expressão de mRNA dos genes *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133* através da técnica de qRT-PCR. A seleção dos genes controles ou de referência endógena foi realizada segundo os critérios que incluem: níveis de expressão semelhantes em diferentes tipos celulares, ausência de comprometimento do gene com ciclo celular ou ativação celular e estabilidade comparável aos demais genes do estudo. Os dados quantitativos referentes à análise de expressão na casuística foram normalizados relativamente à média geométrica de três genes endógenos: *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*), *TBP* (*TATA-box binding protein*) e *GUSB* (*beta glucuronidase*), conforme descritos por Valente *et al.* ^[127]. As reações foram realizadas no aparelho *ABI Prism 7500 Real-Time PCR System* (Life Technologies) pelo método de incorporação de *Sybr Green* (Life Technologies).

A reação foi feita em um volume final 12µL, contendo 3µL de cDNA, 6µL de Power SYBR Green I Master Mix (Life Technologies) e 3µL de solução com par de *primers* em uma concentração final de 150-400nM, que foi otimizada para cada gene. A concentração mínima de *primers* foi determinada pelo *cycle threshold* (Ct) mais baixo e eficiência de amplificação máxima, minimizando amplificação inespecífica. A amplificação de produto único foi confirmada através da análise de suas curvas de dissociação. Os produtos de PCR foram também analisados por eletroforese em gel de agarose, e corados com brometo de etídio, para confirmação da amplificação do tamanho correto do produto. Todas as amostras foram testadas em duplicatas, admitindo-se um desvio de até $\pm 0,4$ e, para cada gene em estudo, foram realizadas em paralelo reações controle sem cDNA.

Para todos os genes foram feitas curvas padrão de uma amostra de cDNA de pool de linhagens de GBM, com diluição seriada em cinco concentrações variando de 1/10 a 1/160. O cálculo de eficiência de amplificação foi baseado no *slope* obtido, pela fórmula $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$. As reações de PCR foram incubação inicial de 50°C por 2 minutos, para ativação da uracil N-glicosilase, denaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Para todas as reações foi realizada uma etapa final de curva de dissociação.

As sequências dos *primers* e outras características, como tamanho do produto de PCR, concentração utilizada na reação e eficiência de amplificação, encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Sequencia de nucleotídeos, tamanho do produto, concentração final e eficiência utilizados na reação de qRT-PCR

Concentração final e eficiência utilizadas na reação de qPCR						
	Gene	Primers (5'-3')		Produto []		Eficiência
		Direito (F), Reverso (R)		(pb)	(nM)	
NORMALIZADORES	HPRT	F: TGAGGATTTGGAAAGGGTGT		118	200	100%
		R: GAGCACACAGAGGGCTACAA				
	GUSβ	F:		101	400	98%
		GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT				
		R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA				
	TBP	F: AGGATAAGAGAGCCACGAACCA		98	200	100%

Gene	Primers (5'-3')	Produto []		Eficiência
TBP	R: CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT			
ID4	F: TGAACAAGCAGGGCGACAG R: CCCTCTCTAGTGCTCCTGGCT	91	150	84%
SOX2	F: AAGAGAACACCAATCCCATCCA R: AGTCCCCCAAAAAGAAGTCCA	95	200	100%
SOX4	F: CAGAAGGGAGGGGGAAACATA R: GAATCGGCACTAAGGAGTTGGT	109	200	100%
4-Oct	F: CGTGAAGCTGGAGAAGGAGA R: CTTGGCAAATTGCTCGAGTT	116	200	105%
NANOG	F: GTGATTTGTGGGCCTGAAGAA R: CCATGGAGGAAGGAAGAGGAG	114	400	88%
CD133	F: TCGGAACTGGCAGATAGCAA R: GTGAACGCCTTGTCTCT	118	400	100%

3.5. Quantificação relativa de expressão gênica

Os valores de Ct foram obtidos utilizando-se o *threshold* determinado manualmente como 0,1 para todos os genes. As amostras foram testadas em duplicatas e considerou-se a média aritmética dos valores de Ct. A fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizada para calcular a expressão relativa dos genes *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4* e *CD133*, que apresentaram *primers* com eficiência $E = 100 \pm 10\%$, onde $\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - \text{média dos Ct dos genes normalizadores (GUSB, HPRT e TBP)}$ e $\Delta\Delta CT = \Delta Ct \text{ tumor} - \text{média } \Delta Ct \text{ tecidos não tumorais}^{[128]}$. Para os genes *ID4* e *NANOG* com eficiências menores que 90%, adotou-se a fórmula descrita por Pfaffl ^[129], $1 + E^{-\Delta\Delta CT}$.

3.6. Análise do perfil de mutação de TP53

A extração de DNA de tecido tumoral foi efetuada conforme previamente descrito (seção 2.1) e a extração de DNA de leucócitos foi efetuada utilizando um protocolo de *salting-out* ^[130].

A análise genômica dos exons codificantes de *TP53* (2 a 11) foi efetuada utilizando PCR seguido de análise de Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP, *single-strand conformation polymorphism*) e sequenciamento.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se oligonucleotídeos desenhados com base em sequências de *TP53* nas regiões intrônicas. Utilizou-se 100ng de DNA de tecido tumoral e de leucócitos periféricos em tampão Tris-HCl 10mM (pH 9,0), KCl 50mM, contendo 1,5mM de MgCl₂, mistura de 50 µM dNTPs 50 µM, 25 pmol de cada *primer* e 1 unidade de Taq DNA polimerase (GE HealthCare, Little Chalfont, United Kingdom), em um volume final de 25 µL. Para o exon 7, foram utilizados 10 pmol de cada primer. As reações de PCR foram realizadas no termociclador (PTC-200, “MJ Research Peltier Thermal Cycler, Watertown, EUA). O seqüenciamento foi realizado utilizando-se os mesmos *primers* da reação de PCR, pelo método automatizado em aparelho ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Life Technologies), utilizando-se o reagente BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Life Technologies). A lista de *primers* utilizados e condições de reação foram previamente descritas pelo grupo^[131,132].

3.7. Imunohistoquímica

O procedimento imunohistoquímico para as proteínas ID4, SOX2 e SOX4 foi realizado em cortes de 4 µm em lâminas de tecidos incluídos em parafina.

Para a detecção imunohistoquímica, secções de tecido foram inicialmente processadas e submetidas à recuperação antigênica. As lâminas foram imersas em tampão citrato 10mM, pH 6,0, e incubadas a 122°C por 3 minutos utilizando Pascal elétrica (BioCare Medical, Walnut Creek, USA). As amostras foram então bloqueadas (com o que?) e posteriormente incubadas com os anticorpos primários, na diluição final de acordo com a Tabela 5, em temperatura 16-20°C por 16 horas. A reação foi revelada utilizando kit comercial (Novolink, Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK) em temperatura ambiente utilizando diaminobenzidina e hematoxilina de Harris para a coloração nuclear. Para todas as reações, foram utilizados controles positivos (Tabela 5).

Tabela 5. Anticorpos primários utilizados para imunohistoquímica e especificações

Proteína	Especificidade	Procedência	Controle Positivo	Diluição final
ID4	Policlonal de coelho	Abcam	Carcinoma de mama	1:100
SOX2	Monoclonal de camundongo	Sigma Aldrich	Esôfago	1:1000
SOX4	Policlonal de Coelho	Sigma Aldrich	Carcinoma de mama	1:800

ID4 (Abcam, Cambridge, UK), SOX2 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e SOX4 (Sigma Aldrich).

3.8. Análise por microscopia óptica

Foi realizada análise semiquantitativa (percentagem de estruturas marcadas) e qualitativa (intensidade da reação) da expressão da proteína obtida por reação imunohistoquímica. A análise foi feita por dois observadores independentes (SKNM e TFAG), obedecendo aos seguintes critérios:

Análise semiquantitativa:

- negativo
- + até 25% das estruturas marcadas
- ++ 26 a 50% das estruturas marcadas
- +++ 51 a 75% das estruturas marcadas
- ++++ mais de 75% das estruturas marcadas.

Análise qualitativa da intensidade da marcação:

- + fraco
- ++ moderado
- +++ intenso

3.9. Casuística

Astrocitomas e tecido cerebral não-neoplásico foram coletados durante o procedimento cirúrgico e imediatamente congelados em nitrogênio

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

A casuística total deste projeto consiste em 175 amostras das quais foram extraídos RNA, conforme mostra a Tabela 6. Os dados clínicos referentes à casuística aqui estudada, como idade, sexo e sobrevida, encontram-se compilados no Anexo 1.

Tabela 6. Casuística do estudo

Histopatologia	Quantidade
Não neoplásico	22
AGI	23
AGII	26
AGIII	18
AGIV	86
Total	175

O presente estudo encontra-se inserido no Projeto Temático da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nº 04/12133-6: “Procura de marcadores moleculares relacionados ao diagnóstico e prognóstico de tumores do sistema nervoso central”, com aprovação da CAPPesq 691/05 e 599/10 (Anexo 2). Os consentimentos pós-informados (Anexo 3) foram obtidos de todos os pacientes com tumor e epilepsia ou seus responsáveis legais e estão sendo acompanhados

cl clinicamente com protocolos padronizados para radioterapia e quimioterapia, bem como para análise da evolução por neuroimagem.

3.10. Análises estatísticas

O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificação da distribuição dos dados. A análise estatística da distribuição da expressão relativa dos seis genes estudados na casuística (NN e AGI-IV), foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido da comparação de Dunn. A análise da comparação dos grupos de AGII com *TP53* mutado e *TP53* selvagem foi efetuada utilizando o teste de Mann-Whitney. Os parâmetros de expressão foram considerados: hipoexpressão, abaixo da mediana; hiperexpressão, acima da mediana. A significância estatística foi estabelecida quando $p < 0,05$.

A coexpressão entre os genes estudados foi realizada através da Correlação de Pearson para amostras com distribuição paramétrica e Spearman-rho, para amostras com distribuição não-paramétrica. O coeficiente de correlação $r \geq 0.7$ foi interpretada como forte correlação, um coeficiente $0.3 \leq r < 0.7$ como correlação moderada e $r < 0.3$ como correlação fraca. Valores positivos de r referem-se a grandezas proporcionais, enquanto valores negativos foram interpretados como grandezas inversamente proporcionais.

A sobrevida foi calculada da data da cirurgia até a data do óbito. A curva de Kaplan Meier de sobrevida foi analisada utilizando-se o teste *log rank*.

Todos os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do programa SPSS versão 15.0 (IBM, Armonk, EUA) e os gráficos de dispersão foram feitos com auxílio do programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

4.RESULTADOS

4.1. Análise da expressão relativa de *ID4* em astrocitomas

A expressão de *ID4* foi analisada primeiramente em 20 amostras de GBM e 10 amostras de tecido cerebral não neoplásico. A expressão relativa diferencial foi estatisticamente maior nos GBM em comparação com as amostras não neoplásicas, como demonstra a Figura 10.

Figura 10: Gráfico de dispersão representando a expressão relativa do gene *ID4*. 10 amostras de tecido não neoplásico (NN) e 20 de glioblastoma (GBM) foram analisadas por qRT-PCR. As linhas pretas horizontais representam as medianas de cada grupo. O teste estatístico utilizado foi *Mann-Whitney*, com *** $p < 0,0005$.

A expressão gênica *ID4* foi a seguir analisada em 153 amostras de diferentes graus de astrocitoma (AGI-IV) e em 22 de tecido cerebral não neoplásico, possibilitando a determinação do seu perfil de expressão durante o processo de malignização. Como mostra a Figura 11, as amostras não neoplásicas exibiram hipoexpressão em relação a todas as amostras tumorais. O padrão de expressão entre os astrocitomas foi crescendo com o incremento da malignidade do grau II para grau III, mas com decaimento da expressão mediana no GBM. Ainda que a mediana do nível de expressão de *ID4* em GBM tenha sido menor do que nos outros astrocitomas difusos, pode-se observar a presença de uma dispersão nos valores de expressão,

com amostras apresentando níveis mais altos, bem como níveis mais baixos que a expressão observada nos demais graus. Essa dispersão também foi observada nos demais graus de malignidade.

Figura 11: Gráficos de dispersão representando a expressão relativa do gene *ID4*. 22 amostras de tecido não neoplásico (NN), 23 de astrocitoma pilocítico (AGI), 26 de astrocitoma de baixo grau (AGII), 18 de astrocitoma anaplásico (AGIII) e 86 de glioblastoma (GBM) foram analisadas por qRT-PCR. As linhas pretas horizontais representam as medianas de cada grupo, sendo em NN = 1,15, AGI = 3,29, AGII = 8,12, AGIII = 11,09, e em GBM = 1,89. O teste estatístico utilizado foi a comparação de *Dunn*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; e *** $p < 0,0005$.

4.2. Análise do impacto da hiperexpressão de *ID4* na sobrevida de pacientes com GBM

Com o intuito de verificar se havia diferença no tempo de sobrevida dos pacientes com GBM com alta expressão do gene *ID4* em relação aos pacientes com baixa expressão, foi realizado o teste de log rank e feita a análise da curva de sobrevida Kaplan-Meier, como demonstra a Figura 12. Não foi observada diferença significativa na sobrevida dos pacientes com níveis hiperexpressos de *ID4* em relação àqueles com hipoexpressão.

Figura 12: Curva de sobrevida relativa aos níveis de expressão de *ID4*. Oitenta casos de GBM foram analisados, divididos de acordo com os níveis de expressão de *ID4* (37 casos com hiperexpressão; 39 casos com hipoexpressão; 4 casos censurados devido ao paciente ainda estar vivo quando a análise foi efetuada). A mediana da sobrevida dos pacientes do grupo com *ID4* hiperexpresso e hipoexpresso foi de 8 e 7 meses, respectivamente. Não houve significância estatística na comparação dos grupos (curva de Kaplan-Meier, teste de *log rang* $p=0,325$).

4.3. Análise da expressão relativa de *SOX2* e correlação com a expressão relativa de *ID4*

A associação de *ID4* e *SOX2* já foi reportada em estudo *in vitro* [78], no qual foi demonstrado haver ativação de *SOX2* por intermédio de *ID4* em linhagem de glioblastoma. Por essa razão, com o intuito de verificar se *ID4* está relacionado com o processo de dediferenciação dos astrocitomas humanos, e dando continuidade a estudo prévio do nosso laboratório [111], os níveis de expressão gênica de *SOX2* foram analisados e comparados aos de *ID4*. É interessante notar que todas as amostras tumorais exibiram medianas maiores do que a do tecido não neoplásico, como mostra a Figura 13.

Figura 13: Gráfico de dispersão representando a expressão relativa do gene SOX2. 22 amostras de tecido não-neoplásico (NN), 23 de astrocitoma anaplásico (AGI), 26 de astrocitoma de baixo grau (AGII), 18 de astrocitoma anaplásico (AGIII) e 86 de glioblastoma (GBM) foram analisadas por qRT-PCR. As linhas pretas horizontais representam a mediana de cada grupo, cujos valores são: NN = 1,06; AGI = 2,13 ; AGII = 3,32; AGIII = 4,90; e AGIV = 2,32. O teste estatístico utilizado foi a comparação de *Dunn*: ** $p < 0,005$; e *** $p < 0,0005$.

Quando as amostras tumorais foram correlacionadas, encontrou-se significância positiva nos casos de AGII, AGIII e GBM (Figura 14).

Figura 14: Correlação das expressões relativas dos genes *ID4* e *SOX2* entre amostras de astrocitoma de baixo grau (AGII, A), astrocitoma anaplásico (AGIII, B) e glioblastoma (GBM, C). O teste estatístico utilizado foi Spearman-rho; os valores de p e o coeficiente de correlação (r) estão indicados em cada gráfico. A significância estatística foi estabelecida quando $p < 0,05$.

No entanto, percebe-se a presença de amostras de GBM exibindo níveis mais altos de *SOX2* em contraste a baixos níveis de expressão relativa de *ID4* (Figura 14C). Esse fato levou a especular a possibilidade de haver outro genes contribuindo para a hiperexpressão de *SOX2* e para o processo de dediferenciação nos astrocitomas, especialmente aqueles já descritos em células tronco neurais e tumorais.

4.4. Análise da expressão relativa de *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133*

Os níveis de expressão relativa de *SOX4*, *OCT-4* e *NANOG* também foram avaliados. Em paralelo, a expressão de *CD133*, que é um marcador de células-tronco, tanto neurais quanto cancerosas, também foi analisada. A Figura 15 mostra o resultado dessa avaliação.

Figura 15: Gráficos de dispersão representando a expressão relativa dos genes *SOX4* (A), *OCT-4* (B), *NANOG* (C) e *CD133* (D). 22 amostras de tecido não neoplásico (NN), 23 de astrocitoma anaplásico (AGI), 26 de astrocitoma de baixo grau (AGII), 18 de astrocitoma anaplásico (AGIII) e 86 de glioblastoma (GBM) foram analisadas por qRT-. As linhas pretas horizontais representam a mediana de cada grupo, cujos valores encontram-se na Tabela 7. A expressão relativa de *NANOG* em algumas amostras foi muito baixo, impossibilitando que aparecessem no gráfico, e resultando no não aparecimento da barra de mediana no caso de NN. O teste estatístico utilizado foi a comparação de *Dunn*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; e *** $p < 0,0005$.

Tabela 7. Valores de mediana da expressão relativa de *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133*

Histologia	Mediana da expressão relativa			
	<i>SOX4</i>	<i>OCT-4</i>	<i>NANOG</i>	<i>CD133</i>
NN	1.09	0.51	0	0.87
AGI	3.04	2.16	0.91	2.39
AGII	9.12	2.92	1.77	1
AGIII	8.86	4	3.84	2.43
GBM	7.63	1.79	0.25	2.26

Valores das medianas referentes às barras horizontais na Figura 15.

4.5. Análise da correlação entre *ID4* e *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133*

Como mostra a Figura 16A, os níveis de expressão relativa de *SOX4* foram similares aos encontrados em *ID4* e *SOX2*. Pôde-se verificar, também, correlação positiva entre os níveis de expressão relativa de *ID4* e *SOX4* (Figura 16 A-C). Foi igualmente observada semelhança no padrão de expressão e correlação positiva entre *ID4* e *OCT-4* (Figura 16 D-F). Diferentemente dos outros genes analisados, diversas amostras de GBM exibiram níveis muito baixos de *NANOG*, e não foi encontrada nenhuma correlação entre a expressão relativa de *NANOG* com a de *ID4* (Figura 16 G-I). Também não foi encontrada correlação entre a expressão relativa de *ID4* e *CD133* (Figura 16 J-L).

Figura 16: Correlação das expressões relativas dos genes *ID4* e *SOX4* (A-C), *OCT-4* (D-F), *NANOG* (G-I) e *CD133* (J-L) entre amostras de astrocitoma de baixo grau (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (GBM). Os casos em que houve correlação estatisticamente significativa são mostrados em preto, e os em que não houve correlação estatisticamente significativa são mostrados em cinza. O coeficiente de correlação (r) foi verificado pelo teste de Spearman-rho, e (r^*), verificado pela Correlação de Pearson. Os valores de r e p estão indicados em cada gráfico. A significância estatística foi estabelecida quando $p < 0,05$.

É interessante notar que GBMs secundários exibiram maior mediana de expressão relativa de *ID4* (2,78) do que os GBMs primários (1,84). *SOX2* (3,96 para secundário e 2,26 para primário) e *SOX4* (48,99 para secundário e 6,74 para primários) também mostraram resultados similares.

A fim de investigar os fatores que contribuem para essa diferença encontrada entre as amostras de GBM, os valores de expressão foram agrupados de acordo com o status de mutação de *TP53*.

4.6. Análise de mutação de *TP53* em astrocitomas difusos

Dando continuidade a estudos prévios do nosso grupo sobre a pesquisa mutacional no gene de *TP53* ^[131,132], foram analisados 130 amostras de DNA de tecido tumoral de pacientes com astrocitomas difusos.

A frequência de mutações em GBM foi de 8,1% (8 de 86), 16,6% em AGIII (3 de 18) e 50% em AGII (13 de 26), como mostra a Tabela 8. A baixa frequência de mutações no gene de *TP53* em casos de GBM caracteriza a presente série como composta em sua maioria de GBMs primários, corroborando a classificação atribuída baseada na apresentação clínica. No entanto, essa baixa frequência, também presente em amostras de AGIII, não permitiu análise estatística dos parâmetros propostos. Contudo, o número amostral de casos permitiu a análise estatística desses parâmetros no grupo de AGII.

Tabela 8. Mutações de *TP53* em astrocitomas difusos

# Caso	Classificação OMS	Localização	Mudança no Aminoácido	Alelo
1*	II	SA site intron 9 / SD site intron 7	ag→tg / gt→at	Heterozigoto / Heterozigoto
2	II	c.206delG / p.Ala69fsX122	A→X	Heterozigoto
3*	II	Codon 273	R→C	Homozigoto
4*	II	Codon 273	R→C	Homozigoto
5*	II	SA site intron 7	gt→at	Heterozigoto

# Caso	Classificação OMS	Localização	Mudança no Aminoácido	Alelo
6	II	Codon 213	R→X	Heterozigoto
7*	II	Codon 273 / Codon 237	R→C / M→I	Homozigoto / Heterozigoto
8	II	Codon 273	R→C	Heterozigoto
9	II	Codon 125	T→T	Homozigoto
10	II	Codon 163	Y →C	Heterozigoto
11	II	Codon 237	M→I	Heterozigoto
12	II	Codon 337	R→H	Heterozigoto
13	II	Codon 113	F→V	Heterozigoto
14*	III	Codon 273	R→C	Homozigoto
15*	III	SA site intron 3	ag→aa	Heterozigoto
16*	III	Codon 273	R→H	Heterozigoto
17*	IV	Codon 125	T→T	Homozigoto
18*	IV	Codon 100 / Codon 248	E→X / R→W	Heterozigoto / Heterozigoto
19	IV	Codon 248	R→W	Heterozigoto
20	IV	c.206delG / p.Ala69fsX122	A→X	Homozigoto
21	IV	Codon 245	G→S	Heterozigoto
22	IV	Codon 62	E→X	Heterozigoto
23	IV	Codon 220	Y→H	Heterozigoto
24	IV	Codon 348	L→S	Heterozigoto

*Casos previamente estudados^[129,130]

E, ácido glutâmico; A, alanina; R, arginina; C, cisteína; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; L, leucina; M, metionina; S, serina; X, *stop codon*; Y, tirosina; T, treonina; W, triptofano.

4.7. Análise da associação de mutações em *TP53* e expressão relativa de *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133*

As amostras de AGII com *TP53* mutado mostraram níveis de expressão relativa estatisticamente mais elevados de *ID4* ($p<0,05$), *SOX2* ($p<0,05$) e *SOX4* ($p<0,005$), como mostra a Figura 17. Não houve diferença entre as amostras com *TP53* selvagem e mutado quando analisada a expressão do gene *OCT-4*. As amostras de GBM secundário exibiram níveis de expressão muito menores do que ambos os grupos de AGII e de GBM primário. Os níveis de mRNA de *NANOG* foram mais altos nas amostras

com *TP53* mutado; no entanto, os níveis de expressão decaíram nas amostras de GBM secundário. Não houve diferença estatística entre os níveis de expressão de *CD133* quando as amostras de AGII foram agrupadas em selvagem vs mutado para *TP53*, e tanto *NANOG* quanto *CD133* exibiram um padrão randômico para expressão gênica de GBM. Não foi encontrada diferença na expressão gênica de nenhum dos genes analisados em relação ao tipo de mutação de *TP53* (*missense*, *nonsense*, sítio de *splicing*).

Figura 17: Comparação dos níveis de expressão gênica relativa nos casos de AGII mutados e selvagens para *TP53*. Foram observadas maiores níveis de expressão de *ID4* (A), *SOX2* (B), *SOX4* (C) e *NANOG* (E) nos casos de AGII com *TP53* mutado. Não houve diferença nos níveis de expressão de *OCT-4* (D) e *CD133* (F) entre os casos com e sem mutação de *TP53*. Teste de Mann-Whitney: * $p < 0.05$ e ** $p < 0.005$.

A visão global da expressão gênica dos diversos genes analisados e das mutações *TP53* nos casos de astrocitomas difusamente infiltrativos pode ser observada no *heatmap* da Figura 18.

Figura 18: Heatmap demonstrando os dados de expressão gênica relativa de *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133* em amostras de astrocitomas de baixo grau, anaplásico e GBM primários e secundários de acordo com o *status* mutacional de *TP53*. Os casos com *TP53* mutado estão assinalados por traços verticais. Os casos de astrocitomas de baixo grau com *TP53* mutado mostraram níveis de expressão mais elevados de *ID4*, *SOX2*, *SOX4* e *NANOG*. A expressão de *CD133* mostrou-se mais heterogênea entre os casos com mutação. *SOX2* e *SOX4* mostraram padrões de expressão semelhantes ao de *ID4*. Da mesma forma, os casos de GBMs secundários também apresentaram maiores níveis de *ID4*, *SOX2*, *SOX4*. *OCT-4* mostrou maior expressão em GBMs primários. *NANOG* e *CD133* apresentaram níveis de expressão heterogêneos entre os casos com e sem mutação de *TP53*.

4.8. Análise da expressão proteica de *ID4*, *SOX2* e *SOX4* em amostras de AGII e GBM

A correlação positiva entre uma maior expressão relativa de *ID4*, *SOX2* e *SOX4* nas amostras de AGII com e mutado e GBM secundário foi confirmada em nível proteico através de imunohistoquímica (Figura 19). As três proteínas codificadas por este genes apresentaram níveis mais baixos em amostras de AGII com *TP53* selvagem do que em AGII com *TP53* mutado, bem como o GBM primário demonstrou hipoexpressão em comparação ao GBM secundário, corroborando os dados de expressão gênica.

Figure 19: Secções de corte da imunohistoquímica de ID4, SOX2 e SOX4 em amostras de: astrocitoma grau II (AGII) com *TP53* selvagem, AGII com *TP53* mutado, GBM primário, GBM secundário. Casos de AGII com *TP53* mutado mostraram maior marcação das três proteínas do que os casos de AGII com *TP53* selvagem. O mesmo se verificou para os casos de GBM secundário comparados aos casos de GBM primário.

4.9. Análise de impacto na sobrevida dos pacientes de GBM em grupos apresentando hipo e hiperexpressão de *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133*

Foi avaliada a diferença na sobrevida dos pacientes com GBM e alta expressão dos genes *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133* em

relação aos pacientes com baixa expressão. Não foi observada diferença significativa na sobrevida dos pacientes quando esses genes foram avaliados isoladamente, nem quando foram analisados em duplas. No entanto, pacientes com elevados níveis de *ID4*, *SOX4* e *OCT-4* exibiram uma sobrevida significativamente menor ($p=0,014$, mediana de 6 meses) do que os pacientes com níveis de expressão gênica baixos desses alvos (média 18 meses), como demonstra a Figura 20.

Figura 20: Curva de sobrevida dos pacientes com GBM com níveis de expressão relativa de *ID4*, *SOX4* e *OCT-4* altos e baixos. Curva de Kaplan-Meier de 25 pacientes com GBM, comparando a hiperexpressão (12 pacientes) dos genes *ID4*, *SOX4* e *OCT-4* e a hipoexpressão (13 pacientes). Pacientes apresentando hipoexpressão desses genes tiveram uma sobrevida três vezes maior (18 meses) em comparação àqueles que apresentaram hiperexpressão (6 meses). curva de Kaplan-Meier, teste de *log rang* $p=0,014$.

5. DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo em astrocitomas humanos a demonstrar a expressão diferencial dos níveis de *ID4* associados ao *status* mutacional de *TP53*, e aos níveis de expressão de *SOX2*, *SOX4* e *OCT-4*.

5.1. Níveis de mRNA de *ID4* elevados em astrocitomas em comparação ao tecido não neoplásico

Os dados mostram um aumento estatisticamente significativo nos níveis de mRNA de *ID4* em astrocitomas quando comparados com o tecido cerebral não neoplásico. Resultados similares foram encontrados para os outros membros da família ID (*ID1-3*), também em astrocitomas, onde foi verificada a presença de níveis mais altos desses IDs em amostras tumorais em comparação com substância branca não neoplásica^[133]. Um outro estudo^[134] imunohistoquímico de *ID4* em amostras humanas de astrocitomas demonstrou um aumento significativo na expressão dessa proteína em GBM quando comparado ao tecido cerebral não neoplásico, a AGII e AGIII. Tal comparação não foi reproduzida em nosso estudo, possivelmente devido ao maior número de amostras aqui analisadas, e à heterogeneidade inerente aos GBMs, corroborada aqui pela dispersão dos níveis de expressão de *ID4* em GBMs. Ainda assim, os níveis aumentados de *ID4* em astrocitoma, principalmente nos astrocitomas difusamente infiltrativos, estão de acordo com o modelo de reexpressão de IDs em tumores^[8], e postulam *ID4* como um marcador para a progressão de malignidade dos astrocitomas.

5.2. Hiperexpressão de *ID4* induzida pela proteína mutada de *TP53* em AGII

Pudemos verificar um aumento de expressão de *ID4* significativo em amostras de AGII que possuem mutação em *TP53* em comparação às

amostras de AGII sem mutação de *TP53*. Estudos em modelos de câncer de mama^[37,38] demonstraram *in vitro* que a hiper-regulação de *ID4* pode ser ativada pela proteína mutada de *TP53*, em conjunto com outros cofatores de transcrição. Mutações em *TP53*, presentes em 50% dos casos de AGII, são consideradas eventos precoces na formação dos astrocitomas^[135]. A associação entre os *status* de mutação de *TP53* e a expressão de *ID4* aqui demonstrada poderia sugerir a hiperexpressão de *ID4* como um evento adicional na formação de astrocitomas. A análise da sobrevida dos pacientes de AGII com *TP53* mutado e selvagem mostrou que os casos com mutação apresentaram uma sobrevida menor em onze meses comparados à sua contraparte mutada. Considerando o reduzido número de casos em que a análise foi possível, há a necessidade de estudos futuros para confirmar estatisticamente esses resultados.

A grande maioria das mutações em *TP53* são do tipo *missense*, localizadas em sítios gênicos específicos ("*hot spots*"), e que não inativam a função da proteína. Ao contrário, essas alterações estabilizam a proteína mutada e aumentam sua atividade oncogênica, aumentando a transcrição de genes-alvo, recrutando outros fatores de transcrição e cofatores (recentemente revisado em ^[136]). No entanto, nenhuma diferença foi encontrada na expressão gênica dos genes analisados quando esta foi comparada aos diferentes tipos de mutação na presente série de amostras de AGII. Estudos futuros poderão elucidar se os casos que possuem mutações inativadoras (*nonsense*) da proteína resultante de *TP53* apresentam um mecanismo alternativo para a ativação da transcrição de *ID4*, *SOX2* e *SOX4*.

5.3. Associação da expressão de *ID4* com a expressão de *SOX2*, *SOX4* e mutações em *TP53*

Os níveis de *SOX2* também estavam aumentados em amostras de AGII com *TP53* mutado, e correlacionaram-se com níveis aumentados de

expressão *ID4*. A hiperexpressão de *SOX2* governada pela inativação de *p53* em fibroblastos embrionários de camundongos foi previamente demonstrada^[137], ainda que o mecanismo permanecesse desconhecido. Uma explicação possível é a de que o aumento de *ID4* ative a transcrição de *SOX2* através da inibição de um micro-RNA, *mir-9**, um regulador negativo direto de *SOX2*, como foi demonstrado em linhagens celulares de glioma^[78]. Nós especulamos que, em amostras humanas de AGII, o aumento de *ID4* em consequência das mutações em *TP53* poderia ser a causa do aumento na expressão de *SOX2*, corroborando os achados da literatura em linhagens celulares. Considerando esses achados, seria plausível especular que *ID4* e *SOX2* agiriam em conjunto após mutação em *TP53* para promover a tumorigênese dos astrocitomas.

A associação entre *SOX4* e *TP53* já foi reportada^[138,139], sendo que, nesses estudos, foi demonstrado que *SOX4* estabiliza a proteína *p53* e inibe a ativação da via apoptótica. Em nosso estudo, *SOX4* mostrou uma associação com a mutação em *TP53* similar aos resultados obtidos em relação à correlação com a expressão de *ID4*. O próximo passo da investigação seria estudar o papel dessa associação no processo de formação dos astrocitomas.

O aumento significativo na expressão de *NANOG* em amostras com *TP53* mutado aqui demonstrado está em acordo com os estudos que mostram ser a proteína *p53* um regulador negativo direto de *NANOG*^[140], e que a ausência de uma proteína funcional aumentaria sua expressão gênica. Os níveis de *NANOG* não se correlacionaram com nenhum dos genes aqui estudados, e seu padrão de expressão foi randômico. Dessa forma, especulamos que *NANOG* funcionaria em uma via diferente na promoção da formação dos astrocitomas.

Os níveis de *CD133* não se alteraram de acordo com o status de mutação de *TP53* em amostras de AGII, tampouco mostraram diferença de expressão entre GBMs primários e secundários. Isso sugere que *CD133*

provavelmente aciona também uma outra via na tumorigênese dos astrocitomas.

A expressão relativa de *OCT-4* também não variou em relação ao status mutacional de *TP53*, e não se correlacionou com *ID4* nas amostras de AGII. No entanto, o padrão de expressão nas amostras de GBM foi extremamente diferente: os secundários exibiram baixíssimos níveis de *OCT-4* em comparação com os GBMs primários. Em conjunto com a correlação positiva entre *OCT-4* e *ID4* em amostras de AGIII e GBM, esses dados sugerem um papel importante nos astrocitomas mais malignos, sendo necessários experimentos adicionais para a análise.

5.4. Impacto da hiperexpressão mútua de *ID4*, *SOX4* e *OCT-4* na sobrevida dos pacientes de GBM primário

As diferenças de expressão em amostras de GBM estavam presentes em todos os genes analisados (Figuras 11, 13 e 15), com alguns casos exibindo altos níveis de mRNA em contraste a outros com níveis quase basais. Mais uma vez, isso se deve a alta heterogeneidade encontrada nesse tumor, tanto celular como molecular^[141], contribuindo para a dificuldade na erradicação do tumor. Por essa razão, foi efetuada a análise do impacto da hiperexpressão dos genes analisados na sobrevida dos pacientes com GBM. Quando agrupamos os genes *ID4*, *SOX4* e *OCT-4* para a análise, pacientes que exibiam altos níveis de expressão desses três genes possuíam uma sobrevida muito menor do que aqueles com níveis mais baixos. Em câncer de bexiga^[142], tanto *ID4* quanto *SOX4* encontravam-se amplificados e hiperexpressos de forma heterogênea, similar aos astrocitomas, e contribuíam para um comportamento tumoral tanto clínico como biológico variável. Como mencionando anteriormente, *OCT-4* e *SOX4* formam um complexo transcricional e induzem a expressão de *SOX2*, aumentando a tumorigenicidade das células de glioma^[92]. Ainda que tenha sido demonstrado que camundongos inoculados com células de glioma

hiperexpressando *OCT-4* sobrevivam menos, nós observamos que apenas o aumento nos níveis de *OCT-4* não é suficiente para diminuir a sobrevida dos nossos pacientes. Uma vez que estudos mostraram que *ID4* sozinho, e *OCT-4* e *SOX4* como um complexo protéico, ativam a expressão de *SOX2*, e que a quimiorresistência está associada ao aumento na expressão tanto de *ID4* quanto de *SOX2*^[38,78], é possível concluir que a múltipla ativação da transcrição de *SOX2* pode prejudicar o prognóstico dos pacientes com GBM.

SOX2 e *OCT-4* são considerados “mestres da pluripotência” em células-tronco embrionárias^[143]. Esse papel é mantido em células-tronco cancerosas (CTC), um subgrupo específico da população de células cancerosas ditas possuidoras de propriedades como resistência à terapia, angiogênese tumoral e recorrência do tumor^[144]. Estudos demonstram que *ID4* também exerce um papel importante na biologia das CTCs, sendo que sua expressão é imperativa para a formação e manutenção da população de CTCs^[145]. Em células-tronco de GBM^[146–149], *ID4* foi identificado como um importante marcador no processo de de-diferenciação, como foi demonstrado nos estudos *in vitro*^[77,78]. Além disso, a reexpressão de genes característicos de células-tronco embrionárias em tumores, incluindo gliomas, foi associada a um fenótipo mais agressivo^[111,124,125]. É possível que essa seja a explicação para a pior sobrevida dos pacientes de GBM que apresentaram hiperexpressão de *ID4*, *SOX4* e *OCT-4*.

Nesse contexto, *ID4* se apresenta como um interessante alvo para estudos futuros e potencial uso terapêutico, considerando seus baixos níveis em tecidos normais e o papel importante que exerce na formação dos astrocitomas e na sobrevida dos pacientes com GBM.

6. CONCLUSÕES

A análise da expressão gênica de *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* e *CD133* em amostras de astrocitomas de diferentes graus de malignidade demonstrou aumento em relação às amostras não neoplásicas.

Houve correlação positiva entre a expressão gênica de *ID4* e *SOX2* em astrocitomas difusamente infiltrativos. Houve, também, correlação entre *ID4* e *SOX4*, e *ID4* e *OCT-4*.

A associação de maior expressão gênica de *ID4*, *SOX2* e *SOX4* foi demonstrada em amostras de AGII com *TP53* mutado e GBM secundário. Esses dados foram confirmados no nível proteico através de imunohistoquímica.

Foi demonstrado que a hiperexpressão conjunta de *ID4*, *SOX4* e *OCT-4* em pacientes de GBM primário está relacionada a um pior prognóstico na sobrevida desses pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 1990;61(1):49–59.
2. Benezra R, Davis RL, Lassar A, Tapscott S, Thayer M, Lockshon D, et al. Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990;599:1–11.
3. Hasskarl J, Münger K. Id proteins--tumor markers or oncogenes? *Cancer Biol. Ther.* 2002;1(2):91–6.
4. Norton JD. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell. Sci.* 2000;113 (22):3897–905.
5. Fong S, Debs RJ, Desprez P-Y. Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. *Trends Mol Med* 2004;10(8):387–92.
6. Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol.* 2003;13(8):410–8.
7. Murre C. Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat. Immunol.* 2005;6(11):1079–86.
8. Perk J, Iavarone A, Benezra R. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2005;5(8):603–14.
9. Yokota Y, Mori S. Role of Id family proteins in growth control. *J. Cell. Physiol.* 2002;190(1):21–8.
10. Miyazono K, Miyazawa K. Id: a target of BMP signaling. 2002;151:40.
11. Ogata T, Wozney JM, Benezra R, Noda M. Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90(19):9219–22.
12. Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Rüther U, Nordheim A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 1999;274(28):19838–45.
13. Ten Dijke P, Korchynski O, Valdimarsdottir G, Goumans M-J. Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. 2003;211(1-2):105–13.

14. Abe J. Bone morphogenetic protein (BMP) family, SMAD signaling and Id helix-loop-helix proteins in the vasculature: the continuous mystery of BMPs pleotropic effects. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006;41(1):4–7.
15. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* 2010;147(1):35–51.
16. Hua H, Zhang Y-Q, Dabernat S, Kritzik M, Dietz D, Sterling L, et al. BMP4 regulates pancreatic progenitor cell expansion through Id2. 2006;281(19):13574–80.
17. Gautschi O, Tepper CG, Purnell PR, Izumiya Y, Evans CP, Green TP, et al. Regulation of Id1 expression by SRC: implications for targeting of the bone morphogenetic protein pathway in cancer. 2008;68(7):2250–8.
18. Ho CC, Zhou X, Mishina Y, Bernard DJ. Mechanisms of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) stimulated inhibitor of DNA binding 3 (Id3) transcription. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011;332(1-2):242–52.
19. Vicente López MA, Vázquez García MN, Entrena A, Olmedillas Lopez S, García-Arranz M, García-Olmo D, et al. Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency. 2011;20(6):1011–9.
20. Cheng X, Wang Y, He Q, Qiu M, Whittemore SR, Cao Q. Bone morphogenetic protein signaling and olig1/2 interact to regulate the differentiation and maturation of adult oligodendrocyte precursor cells. *Stem Cells* 2007;25(12):3204–14.
21. Shepherd TG, Thériault BL, Nachtigal MW. Autocrine BMP4 signalling regulates ID3 proto-oncogene expression in human ovarian cancer cells. *Gene* 2008;414(1-2):95–105.
22. Ahlqvist K, Saamarthy K, Syed Khaja AS, Bjartell A, Massoumi R. Expression of Id proteins is regulated by the Bcl-3 proto-oncogene in prostate cancer. *Oncogene* 2013; 32(12): 1601-8.
23. Higgins S, Wong SHX, Richner M, Rowe CL, Newgreen DF, Werther GA, et al. Fibroblast growth factor 2 reactivates G1 checkpoint in SK-N-MC cells via regulation of p21, inhibitor of differentiation genes (Id1-3), and epithelium-mesenchyme transition-like events. *Endocrinology* 2009;150(9):4044–55.
24. Benezra R, Rafii S, Lyden D. The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* 2001;20(58):8334–41.

25. Subbaramaiah K, Benezra R, Hudis C, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 stimulates Id-1 transcription. *J. Biol. Chem.* 2008;283(49):33955–68.
26. Ao J, Meng J, Zhu L, Nie H, Yang C, Li J, et al. Activation of androgen receptor induces ID1 and promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion. *Molecular oncology* 2012; 6(5): 507-15.
27. Su Y, Zheng L, Wang Q, Bao J, Cai Z, Liu A. The PI3K/Akt pathway upregulates Id1 and integrin $\alpha 4$ to enhance recruitment of human ovarian cancer endothelial progenitor cells. *BMC Cancer* 2010;10:459.
28. Sun X, Li C, Zhuang C, Gilmore WC, Cobos E, Tao Y, et al. Abl interactor 1 regulates Src-Id1-matrix metalloproteinase 9 axis and is required for invadopodia formation, extracellular matrix degradation and tumor growth of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2009;30(12):2109–16.
29. Jo C, Jang BG, Jo SA. MEK1 plays contrary stage-specific roles in skeletal myogenic differentiation. *Cell. Signal.* 2009;21(12):1910–7.
30. Viswanathan P, Wood MA, Walker WH. Follicle-stimulating hormone (FSH) transiently blocks FSH receptor transcription by increasing inhibitor of deoxyribonucleic acid binding/differentiation-2 and decreasing upstream stimulatory factor expression in rat Sertoli cells. *Endocrinology* 2009;150(8):3783–91.
31. Lasorella A, Boldrini R, Dominici C, Donfrancesco A, Yokota Y, Inserra A, et al. Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma. 2002;61(1):301–6.
32. Rockman SP, Currie SA, Ciavarella M, Vincan E, Dow C, Thomas RJ, et al. Id2 is a target of the beta-catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *J. Biol. Chem.* 2001;276(48):45113–9.
33. Jin X, Yin J, Kim S-H, Sohn Y-W, Beck S, Lim YC, et al. EGFR-AKT-Smad signaling promotes formation of glioma stem-like cells and tumor angiogenesis by ID3-driven cytokine induction. *Cancer Lett.* 2011;71(22):7125–34.
34. Jin X, Jin X, Sohn Y-W, Yin J, Kim S-H, Joshi K, et al. Blockade of EGFR signaling promotes glioma stem-like cell invasiveness by abolishing ID3-mediated inhibition of p27(KIP1) and MMP3 expression. *Cancer Lett.* 2013;328(2):235–42.
35. Deliri H, Meller N, Kadakkal A, Malhotra R, Brewster J, Doran AC, et al. Increased 12/15-lipoxygenase enhances cell growth, fibronectin deposition, and neointimal formation in response to carotid injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(1):110–6.

36. Lauritsen JPH, Wong GW, Lee S-Y, Lefebvre JM, Ciofani M, Rhodes M, et al. Marked induction of the helix-loop-helix protein Id3 promotes the gammadelta T cell fate and renders their functional maturation Notch independent. *Immunity* 2009;31(4):565–75.
37. Fontemaggi G, Dell'Orso S, Trisciuglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F, et al. The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;10(16):1086–93.
38. Dell'Orso S, Ganci F, Strano S, Blandino G, Fontemaggi G. ID4: a new player in the cancer arena. *Oncotarget* 2010;1(1):48–58.
39. Bigelow RLH, Williams BJ, Carroll JL, Daves LK, Cardelli JA. TIMP-1 overexpression promotes tumorigenesis of MDA-MB-231 breast cancer cells and alters expression of a subset of cancer promoting genes in vivo distinct from those observed in vitro. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009;117(1):31–44.
40. Welcsh PL, Lee MK, Gonzalez-Hernandez RM, Black DJ, Mahadevappa M, Swisher EM, et al. BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(11):7560–5.
41. Li Y, Hibbs MA, Gard AL, Shylo NA, Yun K. Genome-wide analysis of N1ICD/RBPJ targets in vivo reveals direct transcriptional regulation of Wnt, SHH, and hippo pathway effectors by Notch1. *Stem Cells* 2012;30(4):741–52.
42. Kang Y, Chen C-R, Massagué J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell* 2003;11(4):915–26.
43. Deed RW, Armitage S, Norton JD. Nuclear localization and regulation of Id protein through an E protein-mediated chaperone mechanism. *J. Biol. Chem.* 1996;271(39):23603–6.
44. Bounpheng MA, Dimas JJ, Dodds SG, Christy BA. Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.* 1999;13(15):2257–64.
45. Liu C, Ding B, Wang H, Lengyel P. The MyoD-inducible p204 protein overcomes the inhibition of myoblast differentiation by Id proteins. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(9):2893–905.
46. Luan Y, Yu X-P, Yang N, Frenkel S, Chen L, Liu C-J. P204 Protein Overcomes the Inhibition of Core Binding Factor A-1–Mediated Osteogenic Differentiation by Id Helix-Loop-Helix Proteins. *Mol. Biol. Cell* 2008;19(5):2113–26.

47. Lasorella A, Stegmüller J, Guardavaccaro D, Liu G, Carro MS, Rothschild G, et al. Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature* 2006;442(7101):471–4.
48. Williams SA, Maecker HL, French DM, Liu J, Gregg A, Silverstein LB, et al. USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. *Cell* 2011;146(6):918–30.
49. Riechmann V, Van Cruchten I, Sablitzky F. The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(5):749–55.
50. Riechmann V, Sablitzky F. Mutually exclusive expression of two dominant-negative helix-loop-helix (dnHLH) genes, Id4 and Id3, in the developing brain of the mouse suggests distinct regulatory roles of these dnHLH proteins during cellular proliferation and differentiation of the nervous system. *Cell Growth Differ.* 1995;6(7):837–43.
51. Jen Y, Manova K, Benezra R. Expression patterns of Id1, Id2, and Id3 are highly related but distinct from that of Id4 during mouse embryogenesis. *Dev. Dyn.* 1996;207(3):235–52.
52. Jen Y, Manova K, Benezra R. Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis. *Dev. Dyn.* 1997;208(1):92–106.
53. Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, et al. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. 1999;401(6754):670–7.
54. Lasorella A, Nosedà M, Beyna M, Yokota Y, Iavarone A. Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. 2000;407(6804):592–8.
55. Lasorella A, Rothschild G, Yokota Y, Russell RG, Iavarone A. Id2 mediates tumor initiation, proliferation, and angiogenesis in Rb mutant mice. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25(9):3563–74.
56. Iavarone A, Lasorella A. Id proteins in neural cancer. *Cancer Lett.* 2004;204(2):189–96.
57. Prabhu S, Ignatova A, Park ST, Sun XH. Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17(10):5888–96.
58. Chassot A-A, Turchi L, Virolle T, Fitsialos G, Batoz M, Deckert M, et al. Id3 is a novel regulator of p27kip1 mRNA in early G1 phase and is required for cell-cycle progression. *Oncogene* 2007;26(39):5772–83.

59. Yun K, Mantani A, Garel S, Rubenstein J, Israel MA. Id4 regulates neural progenitor proliferation and differentiation in vivo. *Development* 2004;131(21):5441–8.
60. Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Okaji Y, Tsuno NH, Kobata T, et al. Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiation in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells. *J. Immunol.* 2004;173(9):5801–9.
61. Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 2008;319(5860):195–8.
62. Valdimarsdottir G, Goumans M-J, Rosendahl A, Brugman M, Itoh S, Lebrin F, et al. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 2002;106(17):2263–70.
63. Kuzontkoski PM, Mulligan-Kehoe MJ, Harris BT, Israel MA. Inhibitor of DNA binding-4 promotes angiogenesis and growth of glioblastoma multiforme by elevating matrix GLA levels. *Oncogene* 2010;29(26):3793–802.
64. Lee J-Y, Kang M-B, Jang S-H, Qian T, Kim H-J, Kim C-H, et al. Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27(Kip1) phosphorylation through PTEN inhibition. *Oncogene* 2009;28(6):824–31.
65. Schoppmann SF, Schindl M, Bayer G, Aumayr K, Dienes J, Horvat R, et al. Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer. *Int. J. Cancer* 2003;104(6):677–82.
66. Schindl M, Schoppmann SF, Ströbel T, Heinzl H, Leisser C, Horvat R, et al. Level of Id-1 protein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential, and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors. *Clin. Cancer Res.* 2003;9(2):779–85.
67. Fong S, Itahana Y, Sumida T, Singh J, Coppe J-P, Liu Y, et al. Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(23):13543–8.
68. Dong Z, Liu S, Zhou C, Sumida T, Hamakawa H, Chen Z, et al. Overexpression of Id-1 is associated with tumor angiogenesis and poor clinical outcome in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010;46(3):154–7.
69. Anido J, Sáez-Borderías A, González-Juncà A, Rodón L, Folch G, Carmona MA, et al. TGF- β Receptor Inhibitors Target the

CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 2010;18(6):655–68.

70. Lasorella A, Boldrini R, Dominici C, Donfrancesco A, Yokota Y, Inserra A, et al. Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 2002;62(1):301–6.
71. Löfstedt T, Jögi A, Sigvardsson M, Gradin K, Poellinger L, Pahlman S, et al. Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1: a role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells. 2004;279(38):39223–31.
72. Meng Y, Gu C, Wu Z, Zhao Y, Si Y, Fu X, et al. Id2 promotes the invasive growth of MCF-7 and SKOV-3 cells by a novel mechanism independent of dimerization to basic helix-loop-helix factors. *BMC Cancer* 2009;9:75.
73. Coma S, Amin DN, Shimizu A, Lasorella A, Iavarone A, Klagsbrun M. Id2 promotes tumor cell migration and invasion through transcriptional repression of semaphorin 3F. *Cancer Res.* 2010;70(9):3823–32.
74. Lee S-H, Hao E, Kiselyuk A, Shapiro J, Shields DJ, Lowy A, et al. The Id3/E47 axis mediates cell-cycle control in human pancreatic ducts and adenocarcinoma. *Mol. Cancer Res.* 2011;9(6):782–90.
75. Kamalian L, Forootan SS, Bao ZZ, Zhang Y, Gosney JR, Foster CS, et al. Inhibition of tumorigenicity of small cell lung cancer cells by suppressing Id3 expression. *Int. J. Oncol.* 2010;37(3):595–603.
76. Shuno Y, Tsuno NH, Okaji Y, Tsuchiya T, Sakurai D, Nishikawa T, et al. Id1/Id3 knockdown inhibits metastatic potential of pancreatic cancer. *J. Surg. Res.* 2010;161(1):76–82.
77. Jeon H-M, Jin X, Lee J-S, Oh S-Y, Sohn Y-W, Park H-J, et al. Inhibitor of differentiation 4 drives brain tumor-initiating cell genesis through cyclin E and notch signaling. *Genes Dev.* 2008;22(15):2028–33.
78. Jeon H-M, Sohn Y-W, Oh S-Y, Kim S-H, Beck S, et al. ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9*-mediated suppression of SOX2. *Cancer Res.* 2011;71(9):3410–21.
79. Benezra R. Polycystins: inhibiting the inhibitors. *Nat. Cell Biol.* 2005;7(12):1164–5.
80. Li X, Luo Y, Starremans PG, McNamara CA, Pei Y, Zhou J. Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell cycle through the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nat. Cell Biol.* 2005;7(12):1202–12.

81. Lasorella A, Iavarone A. The protein ENH is a cytoplasmic sequestration factor for Id2 in normal and tumor cells from the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(13):4976–81.
82. Yokota Y. Id and development. *Oncogene* 2001;20(58):8290–8.
83. Bedford L, Walker R, Kondo T, Van Cruchten I, King ER, Sablitzky F. Id4 is required for the correct timing of neural differentiation. *Dev Biol* 2005;280(2):386–95.
84. Samanta J, Kessler JA. Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. *Development* 2004;131(17):4131–42.
85. Neuman T, Keen A, Zuber MX, Kristjansson GI, Gruss P, Nornes HO. Neuronal expression of regulatory helix-loop-helix factor Id2 gene in mouse. *Dev. Biol.* 1993;160(1):186–95.
86. Andres-Barquin PJ, Hernandez MC, Hayes TE, McKay RD, Israel MA. Id genes encoding inhibitors of transcription are expressed during in vitro astrocyte differentiation and in cell lines derived from astrocytic tumors. *Cancer Res.* 1997;57(2):215–20.
87. Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* 2009;136(14):2311–22.
88. Episkopou V. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci.* 2005;28(5):219–21.
89. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003;17(1):126–40.
90. Takanaga H, Tsuchida-Straeten N, Nishide K, Watanabe A, Aburatani H, Kondo T. Gli2 is a novel regulator of sox2 expression in telencephalic neuroepithelial cells. *Stem Cells* 2009;27(1):165–74.
91. Qu Q, Shi Y. Neural stem cells in the developing and adult brains. *Journal of Cellular Physiology* 2009;221(1):5–9.
92. Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, et al. Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J. Biol. Chem.* 2011;286(48):41434–41.
93. Falkner FG, Zachau HG. Correct transcription of an immunoglobulin kappa gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature* 1984;310(5972):71–4.
94. Pesce M, Schöler HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 2001;19(4):271–8.

95. Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17(11):6321–9.
96. Ambrosetti DC, Schöler HR, Dailey L, Basilico C. Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J. Biol. Chem.* 2000;275(30):23387–97.
97. Noisa P, Ramasamy TS, Lamont FR, Yu JSL, Sheldon MJ, Russell A, et al. Identification and characterisation of the early differentiating cells in neural differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS ONE* 2012;7(5):e37129.
98. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 2003;39(5):749–65.
99. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;113(5):643–55.
100. Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 2006;133(6):1193–201.
101. Boiani M, Schöler HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6(11):872–84.
102. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 2007;17(1):42–9.
103. Kuroda T, Tada M, Kubota H, Kimura H, Hatano S, Suemori H, et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25(6):2475–85.
104. Corbeil D, Röper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* 2001;2(2):82–91.
105. Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *J. Pathol.* 2008;214(1):3–9.
106. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90(12):5002–12.

107. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(26):14720–5.
108. Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Exp. Neurol.* 2007;205(2):547–62.
109. Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Lopes L, Nagahashi Marie SK. 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* 2007;1769(7-8):437–42.
110. Ma Y-H, Mentlein R, Knerlich F, Kruse M-L, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J. Neurooncol.* 2008;86(1):31–45.
111. Holmberg J, He X, Peredo I, Orrego A, Hesselager G, Ericsson C, et al. Activation of neural and pluripotent stem cell signatures correlates with increased malignancy in human glioma. *PLoS ONE* 2011;6(3):e18454.
112. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21(21):2683–710.
113. Collins VP. Brain tumours: classification and genes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2004;75 Suppl 2:ii2–11.
114. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97–109.
115. Lang FF, Gilbert MR. Diffusely infiltrative low-grade gliomas in adults. *J. Clin. Oncol.* 2006;24(8):1236–45.
116. Ruiz J, Lesser GJ. Low-grade gliomas. *Curr Treat Options Oncol* 2009;10(3-4):231–42.
117. Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J. Neurooncol.* 2004;70(2):137–60.
118. Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J. Mol. Med.* 2004;82(10):656–70.
119. Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Role of gemistocytes in astrocytoma progression. *Lab. Invest.* 1997;76(2):277–84.

120. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2013;19(4):764–72.
121. Smits A. Low-grade gliomas: clinical and pathobiological aspects. *Histol. Histopathol.* 2002;17(1):253–60.
122. Van den Boom J, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, et al. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* 2003;163(3):1033–43.
123. Grzmil M, Hemmings BA. Deregulated signalling networks in human brain tumours. *Biochim. Biophys. Acta* 2010;1804(3):476–83.
124. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.* 2008;40(5):499–507.
125. Guo Y, Liu S, Wang P, Zhao S, Wang F, Bing L, et al. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* 2011;59(4):763–75.
126. Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* 2002;12(4):656–64.
127. Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol. Biol.* 2009;10:17.
128. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
129. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
130. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
131. Uno M, Oba-Shinjo SM, De Aguiar PH, Leite CC, Rosemberg S, Miura FK, et al. Detection of somatic TP53 splice site mutations in diffuse astrocytomas. *Cancer Lett* 2005;224:321–7.
132. Uno M, Oba-Shinjo SM, Wakamatsu A, Huang N, Ferreira Alves VA, Rosemberg S, et al. Association of TP53 mutation, p53 overexpression, and p53 codon 72 polymorphism with susceptibility to

apoptosis in adult patients with diffuse astrocytomas. *Int J Biol Markers* 2006;21:50–7.

133. Vandeputte DAA, Troost D, Leenstra S, Ijlst-Keizers H, Ramkema M, Bosch DA, et al. Expression and distribution of id helix-loop-helix proteins in human astrocytic tumors. *Glia* 2002;38(4):329–38.
134. Zeng W, Rushing EJ, Hartmann DP, Azumi N. Increased inhibitor of differentiation 4 (id4) expression in glioblastoma: a tissue microarray study. *J Cancer* 2010;1:1–5.
135. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol* 2011;28(3):177–83.
136. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.* 2012;26(12):1268–86.
137. Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009;460(7259):1140–4.
138. Hur W, Rhim H, Jung CK, Kim JD, Bae SH, Jang JW, et al. SOX4 overexpression regulates the p53-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma: clinical implication and functional analysis in vitro. *Carcinogenesis* 2010;31(7):1298–307.
139. Pan X, Zhao J, Zhang W-N, Li H-Y, Mu R, Zhou T, et al. Induction of SOX4 by DNA damage is critical for p53 stabilization and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106(10):3788–93.
140. Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat. Cell Biol.* 2005;7(2):165–71.
141. Bonavia R, Inda M-M, Cavenee WK, Furnari FB. Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. *Cancer Res.* 2011;71(12):4055–60.
142. Wu Q, Hoffmann MJ, Hartmann FH, Schulz WA. Amplification and overexpression of the ID4 gene at 6p22.3 in bladder cancer. *Mol. Cancer* 2005;4(1):16.
143. Mallanna SK, Rizzino A. Systems biology provides new insights into the molecular mechanisms that control the fate of embryonic stem cells. *J. Cell. Physiol.* 2012;227(1):27–34.
144. Sampieri K, Fodde R. Cancer stem cells and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 2012;22(3):187–93.

145. Park S-J, Kim R-J, Nam J-S. Inhibitor of DNA-binding 4 contributes to the maintenance and expansion of cancer stem cells in 4T1 mouse mammary cancer cell line. *Lab Anim Res* 2011;27(4):333–8.
146. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821–8.
147. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396–401.
148. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2004;23(58):9392–400.
149. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004;64(19):7011–21.

8. Anexos

- 8.1. **Anexo 1:** Informações e dados clínicos dos pacientes incluídos nesse trabalho.
- 8.2. **Anexo 2:** Aprovação do estudo pela CAPPesq.
- 8.3. **Anexo 3:** Exemplo do Termo de Consentimento Pós-Informado dos entregue aos pacientes incluídos nesse trabalho.
- 8.4. **Anexo 4:** Carta de aceite da revista PLoS One do artigo referente ao presente estudo.
- 8.5. **Anexo 5:** Artigo referente ao presente estudo submetido e aceito pela revista PLoS One.

8.1. ANEXO 1

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	48-6846-3	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	31/01/2002		7a 1m	
NN	9	232	N	FPB	M	28a	2920291E		08/10/73	14/02/2002		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	JMR	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	54-5969-9	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	7048016-C	63-0783-3	14/07/64	19/05/04		4a 9m	
NN	20	805	N	SAD	F	37a	7047635-A	64-1342-0	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	7047021-J		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 1m	
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	

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)
AGI	33	594	N	JCFS	M	18a	3367062G	59-9510-8	13/06/85	24/09/03		5a 5m	
AGI	34	601	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	66-7407-0	13/04/87	07/03/05		3a 11m	
AGI	40	946	N	PRTS	M	9a	3206638-A	66-9467-5	06/11/95	23/03/05		3a 11m	
AGI	41	995	N	JTAN	M	22a	13685104-G	68-3495-7	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	23/3/01	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

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)
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	MGCJ	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	16/3/01	19/03/07		77
AGIII	75	233	41	OAA	F	58a	13567029I	51-9554-3	12/07/43	15/02/2002	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 6m	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	24/11/00	15/09/04		45
GBM	91	74	50	UC	M	74a	7045824G	47-2426-7	25/10/26	19/3/01	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	27/09/03		17

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)
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//2003		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	58-4389-8	11/10/46	10/06/03	28/05/05		23
GBM	116	522	69	MFC	M	48a	13498664F	58-6616-2	20/05/55	27/06/03	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	638	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	60-7753-6	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	

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)
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	AG	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	12/03/06		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	13714223-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	13/01/06	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	18/04/1951	03/03/2006	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

8.2. Anexo 2

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/10/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0599/10**, intitulado: **"EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES DA FAMÍLIA ID EM ASTROCITOMA DE BAIXO GRAU EM RELAÇÃO AO OLIGODENDROGLIOMA"** apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**.

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

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

Pesquisador (a) Executante: **Thais Fernanda de Almeida Galatro**

CAPPesq, 14 de Outubro de 2010

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

8.3. Anexo 3

Termo de Consentimento Pós-Informado

Você está sendo admitido(a) neste hospital para tratamento de doença do sistema nervoso central. Como parte de seu tratamento, você será submetido a um exame de sangue e cirurgia na qual se retirará um fragmento de seu cérebro onde está o tumor. Este sangue e o material obtido do cérebro são utilizados em exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. Nestes exames sempre há sobra de material que se toma sem utilidade.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico das doenças do sistema nervoso central, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca de novos genes ou de lesões genéticas em genes já existentes.

Este material restante, que não seria utilizado para o diagnóstico será congelado e posteriormente utilizado para pesquisa científica. O uso deste material não implicará riscos adicionais para você, nem exigirá que se submeta a qualquer procedimento adicional. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, de acordo com o processo nº 830/D1, e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital.

Todo material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade será preservada. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você concordar em permitir o uso deste material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética.

Assinatura do(a) paciente ou Responsável Legal: _____

Nome do(a) paciente: _____

RG do Prontuário Médico: _____

Médico Responsável: _____

LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÕES EM NEUROLOGIA

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

8.4. Anexo 4

PLOS ONE Decision: Accept [PONE-D-12-29720R2] 12 de Março de 2013 3:17

De: em pone 0 31b20f 88a9737e Em nome de: PLOS ONE

Para: Thais Fernanda de Almeida Galatro

PONE-D-12-29720R2
Differential expression of ID4 and its association with TP53 mutation, SOX2, SOX4 and OCT-4 expression levels
PLOS ONE

Dear Dr Thais Fernanda de Almeida Galatro,

I am pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for publication in PLOS ONE.

Your manuscript will now be passed on to our Production staff, who will check your files for correct formatting and completeness. After this review, they may return your manuscript to you so that you can make necessary alterations and upload a final version.

Before uploading, you should check the PDF of your manuscript very closely. THERE IS NO AUTHOR PROOFING. You should therefore consider the corrected files you upload now as equivalent to a production proof. The text you supply at this point will be faithfully represented in your published manuscript exactly as you supply it. This is your last opportunity to correct any errors that are present in your manuscript files.

In addition, now that your manuscript has been accepted, please log into EM at <http://www.editorialmanager.com/pone> and update your profile. Click on the "Update My Information" link at the top of the page. Please update your user information to ensure an efficient production and billing process.

If you or your institution will be preparing press materials for this manuscript, you must inform our press team in advance. Please contact them at ONEpress@plos.org.

Please contact us at plosone@plos.org if you have any questions, concerns, or problems, and thank you for submitting your work to our journal.

With kind regards,
Javier S Castresana

8.5. Anexo 5

Title of Paper: Differential expression of *ID4* and its association with *TP53* mutation, *SOX2*, *SOX4* and *OCT-4* expression levels

Authors: Thais Fernanda de Almeida Galatro¹, Miyuki Uno^{1,2}, Sueli Mieko Oba-Shinjo^{1,2}, Antonio Nogueira Almeida¹, Manoel J. Teixeira¹, Sérgio Rosemberg³, and Suely Kazue N. Marie^{1,2}

Institutional affiliations: ¹Department of Neurology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo/SP, Brazil. ²Center of Translational Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo/SP, Brazil. ³Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo/SP, Brazil

Corresponding author: Thais Fernanda de Almeida Galatro. Department of Neurology, School of Medicine, University of São Paulo. Avenida Doutor Arnaldo 455, Cerqueira César, 4^o. andar, sala 4110. 01246-903, São Paulo, SP – Brazil. Phone: +55 11 3061-8559. E-mail: thaisgalatro@usp.br

Abstract

Inhibitor of DNA Binding 4 (ID4) is a member of the helix-loop-helix ID family of transcription factors, mostly present in the central nervous system during embryonic development, that has been associated with *TP53* mutation and activation of *SOX2*. Along with other transcription factors, *ID4* has been implicated in the tumorigenic process of astrocytomas, contributing to cell dedifferentiation, proliferation and chemoresistance. In this study, we aimed to characterize the *ID4* expression pattern in human diffusely infiltrative astrocytomas of World Health Organization (WHO) grades II to IV of malignancy (AGII-AGIV); to correlate its expression level to that of *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4* and *NANOG*, along with *TP53* mutational status; and to correlate the results with the clinical end-point of overall survival among glioblastoma patients. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) was performed in 130 samples of astrocytomas for relative expression, showing up-regulation of all transcription factors in tumor cases. Positive correlation was found when comparing *ID4* relative expression of infiltrative astrocytomas with *SOX2* ($r=0.50$; $p<0.005$), *SOX4* ($r=0.43$; $p<0.005$) and *OCT-4* ($r=0.39$; $p<0.05$). The results from *TP53* coding exon analysis allowed comparisons between wild-type and mutated status only in AGII cases, demonstrating significantly higher levels of *ID4*, *SOX2* and *SOX4* in mutated cases ($p<0.05$). This pattern was maintained in secondary GBM and further confirmed by immunohistochemistry, suggesting a role for *ID4*, *SOX2* and *SOX4* in early astrocytoma tumorigenesis. Combined hyperexpression of *ID4*, *SOX4* and *OCT-4* conferred a much lower (6 months) median survival than did hypoexpression (18 months). Because both *ID4* alone and a complex of *SOX4* and *OCT-4* activate *SOX2* transcription, it is possible that multiple activation of *SOX2* impair the prognosis of GBM patients. These observational results of associated expression of *ID4* with *SOX4* and *OCT-4* may be used as a predictive factor of prognosis upon further confirmation in a larger GBM series.

Introduction

Inhibitor of DNA Binding (ID) proteins (ID1-4) belong to the helix-loop-helix (HLH) superfamily of transcription factors and exert their functions through the highly conserved HLH dimerization domain. Due to the lack of a DNA binding domain, IDs sequester and inhibit the activity of their specific target proteins, playing important roles in cell cycle control, growth, differentiation, angiogenesis and tumorigenesis [1]–[4]. In healthy organisms, *ID* expression is up-regulated in stem and progenitor cells, maintaining self-renewal capacity, pluripotency and an undifferentiated state. However, *ID* expression declines to basal values when cells differentiate towards the destined specific lineage [5], [6]. The expression of ID1-3 proteins is widespread, while the ID4 expression pattern is restricted to the developing brain, particularly in neural progenitor cells [7]. The overexpression of IDs in tumor cells has been suggested to induce reversion to an embryonic-like state, with high rates of proliferation, migration and neo-angiogenesis facilitating tumor formation [4].

Astrocytomas are the most common primary brain tumors. World Health Organization (WHO) classifies the astrocytomas into four grades: grade I or pilocytic astrocytoma, grade II, or low-grade astrocytoma (AGII), grade III, or anaplastic astrocytoma (AGIII) and grade IV astrocytoma or glioblastoma (AGIV or GBM) [8]. Diffusely infiltrative astrocytomas (AGII-GBM) invade the surrounding normal brain tissue, hampering tumor resection. GBM is the most malignant and frequent brain tumor in adults and they can be divided into two subgroups: primary GBM, which arise de novo, and secondary GBM, which results from the progression of a lower grade astrocytoma [9], [10]. The malignant transformation of astrocytomas, is associated with augmented ID expression [3], particularly ID4 [11], [12]. Interestingly, the up-regulation of *ID4* has been associated with *TP53* mutation status [13], [14], which is an early event in astrocytoma progression; additionally, *TP53* mutation is more related to secondary GBM [9]. Moreover, hyperexpression of *ID4* was found to be a key regulator of malignant transformation of *Ink4a/Arf*^{-/-} (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoform 4) murine astrocytes in *in vivo* experiments, resulting in formation of high grade gliomas according to clinical and histological analysis [15]. These results may be consistent with astrocyte dedifferentiation to an immature progenitor-like state. It has also been demonstrated that ID4 protein activates SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2)

transcription in GBM and glioma stem cells [16]. Similarly, SOX4 and POU class 5 homeobox 1 (OCT-4) proteins were also shown to activate SOX2 transcription in glioma initiating cells [17], [18]. Along with Nanog homeobox (*NANOG*), these transcription factors are highly expressed in embryonic, progenitor, and tumor stem cells, in contrast to the low levels of expression that are found in differentiated cells [19]–[21].

This study aimed to characterize the *ID4* expression pattern in human astrocytomas of grades II to IV of malignancy; to correlate its expression level to that of SOX2, SOX4, OCT-4 and *NANOG*, along with *TP53* mutational status; and to correlate the results with the clinical end-point of overall survival among GBM patients. In parallel, expression of the neural and brain tumor stem cell marker *CD133* was assessed to better evaluate the progenitor cell condition [22]–[23].

Materials and Methods

Tissue samples and ethical statement

One hundred and thirty diffusely infiltrative astrocytomas (grades II to IV) were obtained during therapeutic surgery of patients treated by the Neurosurgery Group of the Department of Neurology at Hospital das Clínicas at the School of Medicine of the University of São Paulo, in the period of 2000 to 2007. The cases were categorized according to the WHO grading system [8] by neuropathologists from the Division of Pathological Anatomy of the same institution. The studied series consisted of 26 AGII, 18 AGIII, 86 GBM, and 22 non-neoplastic (NN) brain anonymized cases from epilepsy patients subjected to temporal lobectomy. Demographic data of the studied cases is presented in Table 1, and the clinical findings are presented in Table S1. Samples were macrodissected and immediately snap-frozen in liquid nitrogen upon surgical removal. A 4µm-thick cryosection of each sample was analyzed under a light microscope after hematoxylin-eosin staining for assessment of necrotic, cellular debris and non-neoplastic areas (in tumor samples), followed by removal from the frozen block by microdissection prior to DNA and RNA extractions [24], [25]. Eighty-one GBM patients (94.2%) presented with onset of clinical symptoms within 3 months prior to diagnostic surgical intervention and were classified as presenting primary GBM. Five GBM patients (5.8%) presented a tumor which was resected over one year after a lower grade astrocytoma (grade II or III), and were designated as secondary GBM cases. Written informed consent was obtained from all patients according to the ethical guidelines approved by the Department of Neurology, School of Medicine, University of São Paulo (0599/10).

Sample preparation

Total RNA was extracted from frozen tissues (tumor and non-neoplastic) using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Evaluation of RNA concentration and purity were carried out by measuring absorbance at 260 and 280 nm. Ratios of 260/280 measures 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. The first strand of cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA previously treated with 1 unit of DNase I (FPLC-pure, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using random and oligo (dT) primers, RNase inhibitor, and SuperScript III reverse transcriptase according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies, Carlsbad, USA). The resulting cDNA was subsequently treated with 1 unit of RNase H (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), diluted with TE buffer, and stored at -20°C until later use.

Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

The relative expression level of *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* and *CD133* were analyzed by qRT-PCR, using the SYBR Green approach. Quantitative data were normalized in relation to the geometric mean of three housekeeping genes, suitable for the analysis: hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*), glucuronidase beta (*GUSB*) and TATA box binding protein (*TBP*), as previously demonstrated by our group [26]. The primers were designed to amplify 80–120 bp amplicons, with a melting temperature of 60°C and were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) as follows (5' to 3'): *ID4* F: TGAACAAGCAGGGCGACAG, *ID4* R: CCCTCTCTAGTGCTCCTGGCT; *SOX2* F: AAGAGAACACCAATCCCATCCA, *SOX2* R: AGTCCCCCAAAAAGAAGTCCA; *SOX4* F: CAGAAGGGAGGGGGAAACATA, *SOX4* R: GAATCGGCACTAAGGAGTTGGT; *NANOG* F: GCAAGAACTCTCCAACATCCTGA, *NANOG* R: CATTGCTATTCTTCGGCCAGTT; *OCT-4* F: CGTGAAGCTGGAGAAGGAGA, *OCT-4* R: CTTGGCAAATTGCTCGAGTT; *CD133* F: TCGGAAACTGGCAGATAGCAA, *CD133* R: GTGAACGCCTTGTCCT; *HPRT* F: TGAGGATTTGGAAAGGGTGT, *HPRT* R: GAGCACACAGAGGGCTACAA; *GUSB* F: GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT, *GUSB* R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA; *TBP* F: AGGATAAGAGAGCCACGAACCA, *TBP* R: CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT. The minimum primer concentrations necessary were determined to give the lowest threshold cycle (Ct) and maximum amplification efficiency, while minimizing non-specific amplification. Primer concentrations used were 150 nM for *ID4*, 200 nM for *HPRT*, *TBP*, *SOX2*, *SOX4* and *OCT-4*, and 400 nM for *GUSB*, *NANOG* and *CD133*. Standard curve was established to ensure amplification efficiency and analysis of melting curves demonstrated a single peak

for all PCR products. Additionally, agarose gel electrophoresis was employed to check the size of the PCR product amplified. SYBR Green I amplification mixtures (12 μ l) contained 3 μ l of cDNA, 6 μ l of 2X Power SYBR Green I Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA) and forward and reverse primers. PCR reactions were run on an ABI Prism 7500 sequence detector (Life Technologies, Carlsbad, USA) as follows: 2 min at 50°C, 10 min of polymerase activation at 95°C, and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. All the reactions were performed in duplicate. The following equations were applied to calculate gene relative expression according to primer efficiency (E) in tumor samples *versus* the mean of non-neoplastic tissues: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [27] for *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4* and *CD133*; and $1+E^{-\Delta\Delta Ct}$ [28] for *ID4* and *NANOG*, where ΔCt = Ct specific gene- geometric mean Ct of housekeeping genes and $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt tumor – mean ΔCt non-neoplastic. For statistical analysis, gene expression status was scored as high or low expression in relation to the median relative expression value at each grade of astrocytoma.

DNA extraction and *TP53* mutational analyses

DNA extraction was performed from frozen tumor tissues using All Prep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and peripheral leukocyte DNA was extracted by a salting-out procedure [29].

Whole coding *TP53* exons (2 to 11) analysis was performed using the polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) assay and DNA sequencing, as previously reported [30,31].

Immunohistochemistry

For immunohistochemical detection, tissue sections were routinely processed and subjected to antigen retrieval. Briefly, slides were immersed in 10 mM citrate buffer, pH 6.0 and incubated at 122°C for 3 min using an electric pressure cooker (BioCare Medical, Walnut Creek, USA). Specimens were then blocked and further incubated with the following antibodies raised against human ID4 (rabbit polyclonal, ab20988, Abcam, Cambridge, UK, 1:100), SOX2 (mouse clone 6, S1451, Sigma Aldrich, St. Louis, USA, 1:100), SOX4 (rabbit polyclonal,

S7318, Sigma Aldrich, St. Louis, USA, 1:800) at 16-20°C for 16 hours. Development of the reaction was performed with a commercial kit (Novolink; Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK) at room temperature, using diaminobenzidine and Harris hematoxylin for nuclear staining. Optimization using positive controls suggested by the manufacturer of each antibody (breast carcinoma for ID4 and SOX4 antibodies, and normal esophagus for SOX2), was performed in order to obtain optimal dilution. Staining intensity of tissue sections was evaluated independently by two observers (SKNM and TFAG). A semi-quantitative score system considering both intensity of staining and percentage of cells was applied as follows: for intensity of staining, 0=negative, 1=weak, 2=moderate and 3=strong; for cell percentage, 0=no cells stained, 1=10–25%, 2 =26–50%, 3=51–75% and 4 = 76–100%. Only cases with positive cell staining with scores ≥ 2 were considered as positive. Digital photomicrographs of representative fields were captured and processed using Picasa 3 (Google, Mountain View, USA).

Statistical analysis

The statistical analysis of relative gene expression in different grades of astrocytoma was assessed using the Kolmogorov-Smirnov normality test, and the non-parametric Kruskal-Wallis and Dunn tests. Correlation between relative gene expression values was assessed using the non-parametric Spearman-rho correlation test and the parametric Pearson's correlation test. The Mann-Whitney test was used to compare *TP53* mutational status and relative gene expression. The Kaplan-Meier survival curve was analyzed using the *log-rank* (Mantel Cox) test and multivariate analysis using the Cox proportional hazards model. The logistic regression model included the following parameters: age at diagnosis, gender (female *versus* male), degree of tumor surgical resection (gross total resection (GTR) *versus* partial resection (PR) and gene expression status (hyper or hypoexpression). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Calculations were performed using SPSS, version 15.0 (IBM, Armonk, USA).

Results

Relative expression levels in diffusely infiltrative astrocytomas

Gene expression analysis by qRT-PCR for *ID4* showed higher median expression levels in all diffusely infiltrative astrocytoma cases (AGII to GBM) relative to the NN cases, and comparison among the groups was statistically significant (Figure 1A, $p < 0.0005$, Kruskal-Wallis test). Although the *ID4* median expression level in GBM cases was lower than in AGII and AGIII, there was a variability of these expression values, with cases presenting both higher and lower values than the other grades. Similar variability of *ID4* expression was also observed in AGII and AGIII (Figure 1A). A multivariate Cox regression model (which considered age at diagnosis, gender, degree of tumor surgical resection, and *ID4* expression status) showed that *ID4* expression (hyper or hypoexpression) alone had no impact on patient's prognosis. Only age at diagnosis was an independent prognostic factor (hazard ratio=1.02, $p=0.02$). *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG*, and *CD133* also showed higher mRNA levels in AGII-GBM cases in comparison to NN, as shown in Figure 1B-1F. *SOX2* expression levels were compared to *ID4* levels to verify the degree of their co-expression in human diffusely infiltrative astrocytomas. Interestingly, the correlation analysis of *SOX2* showed mRNA levels similar to *ID4*, with positive correlation found in AGII ($r=0.731$; $p=0.00002$), AGIII ($r=0.671$; $p=0.006$) and GBM ($r=0.334$; $p=0.0006$). Next, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* and *CD133* expression levels were also evaluated. *SOX4* expression levels were similar to those of *ID4*, although positive correlation was only found in AGII ($r=0.568$; $p=0.002$) and GBM ($r=0.414$; $p=0.00009$). *OCT-4* relative expression correlated positively with *ID4* in AGIII ($r=0.551$; $p=0.02$) and GBM ($r=0.364$; $p=0.01$). In contrast to the other analyzed genes, several GBM cases exhibited very low expression levels of *NANOG*, and no correlation was found between *ID4* and *NANOG* expression levels. *ID4* and *CD133* expressions did neither not correlate. An overview of the results of analyzed correlations is shown in Figure 2.

It is interesting to note that secondary GBM cases (red dots on Figure 1) exhibited a higher median expression level for *ID4* (2.78) than did primary GBM cases (1.84). Similar results were obtained for *SOX2* (3.96 for secondary and 2.26 for primary GBM) and *SOX4* (48.99 for secondary and 6.74 for primary). In contrast, the median of *OCT-4* expression was 0.47 in secondary GBM and 2.03 in primary GBM; the median of *NANOG* expression level in secondary GBM was 0.13 while

0.35 in primary GBM, and the median of *CD133* expression level was 1.28 for secondary GBM and 2.26 for primary GBM. To further investigate the factors contributing to these differences, the expression values were analyzed according to *TP53* mutation status.

Association between *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, and *NANOG* mRNA expressions and *TP53* mutation status

The frequency of *TP53* mutation was 11.6% in GBM (10 out of 86), 16.6% in AGIII (3 out of 18) and 50% in AGII (13 out of 26), as described in our previous studies [30,31] (Table S1). Our GBM series is composed mainly by primary GBMs, which explains the low frequency of *TP53* mutation and corroborates the classification based on clinical presentation. The low frequency of *TP53* mutations in GBM and AGIII cases did not permit statistical analyses of the proposed parameters; however, this analysis was feasible among AGII cases. Interestingly, *TP53*-mutated AGII cases showed higher relative expression of *ID4* when compared to AGII cases with wild-type *TP53* ($p=0.048$) (Figure 3A). Also, *SOX2* ($p=0.044$), *SOX4* ($p=0.004$) and *NANOG* ($p=0.025$) relative expressions were higher in mutated than in wild-type *TP53* in AGII cases (Figure 3B, 3C and 3E respectively). No difference was found for *OCT-4* relative expression between wild-type and mutated *TP53* cases (Figure 3D). Despite the fact that *TP53*-mutated AGII cases displayed slightly higher relative expression of *CD133*, the difference was not statistically significant (Figure 3F). No difference in expression was found regarding the different types of *TP53* mutations (whether missense, nonsense or in splicing sites). Mann-Whitney test was applied for all the above statistical analysis. Moreover, no significant impact was observed in the overall survival time or in the progression free survival time in AGII cases, concerning either relative expression levels of *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT4*, *NANOG*, and *CD133* or *TP53* mutational status (results presented Table S2). Although *TP53* mutated AGII cases presented a median of 40 months of overall survival time compared to a median of 51 months of wild-type *TP53* AGII cases, it did not reach statistical significance because of the small number of cases in each group (Figure 3, white lozenges for deceased AGII patients).

Associated expression of *ID4*, *SOX2* and *SOX4* with *TP53* mutational status was further confirmed at the protein level by immunohistochemistry. The wild type *TP53* AGII cases (Figure 4A-4C) showed weak or no staining for the three targets in comparison to the *TP53*-mutated cases (Figure 4D-4F), as did the primary GBM cases (Figure 4G-4I) when compared to the secondary GBM (Figure 4J-4L) cases.

The overview of *TP53* mutation status, relative gene expression for AGII, and expression differences among AGII, AGIII, primary and secondary GBM are displayed as heatmap in Figure 5.

Impact of *ID4*, *SOX4* and *OCT-4* expression levels on clinical outcome for GBM patients

Considering the variability of the relative expression values found in GBM cases, we evaluated the impact of up-regulation of the analyzed genes on overall patient survival. For the evaluation, conditions were determined for high and low gene expression. Secondary GBM cases were excluded from this analysis due to the small number of cases. None of the genes had an impact on overall survival, either on their own or when grouped in pairs for the determined conditions (Figure S1). However, there was a significant difference when comparing GBM cases with high *ID4*, *SOX4* and *OCT-4* expressions (median survival of 6 months) with cases with low expressions for the three genes (median survival of 18 months) (*log rank* $p=0.014$), as shown on the Kaplan-Meier survival curve in Figure 6.

Discussion

We have demonstrated a differential expression of *ID4* in human diffusely infiltrative astrocytoma cases demonstrating association with *TP53* mutation status, as well as to *SOX2*, *SOX4* and *OCT-4* mRNA expression levels.

***ID4* mRNA levels are elevated in astrocytomas in comparison to non-neoplastic brain tissue**

Our study demonstrated significantly higher mRNA expression levels of *ID4* in astrocytomas when compared to non-neoplastic brain tissue. Similar results have also been described for ID1-3 proteins in astrocytomas, with higher expression levels in tumors than in non-neoplastic white-matter [32]. A previous immunohistochemical report has shown stronger ID4 expression in GBM compared to AGII, AGIII and normal brain tissue [12]. Such association was not significant in our study, most probably due to a larger number of cases analyzed herein, and also to the heterogeneity inherent to GBM, here corroborated by the widespread *ID4* mRNA expression among the studied GBM cases. Nevertheless, the increased *ID4* expression level in diffusely infiltrative astrocytoma is in accord with the tumor re-expression model of IDs [4], postulating *ID4* as an additional marker of astrocytoma progression in malignancy.

A recent report [34] has shown that *ID4* promoter methylation was an independent factor on patient's prognosis, and that association of *ID4* promoter methylation and *MGMT* methylation status conferred significantly longer overall survival to GBM patients. We assessed the correlation between *ID4* hypoexpression and the *MGMT* methylation status in GBM, previously reported by our group [33]. The Cox regression model showed only *MGMT* status as an independent factor for prognosis (hazard ratio = 4.684, $p=0.014$), differing from the previous report. Further studies on *ID4* promoter methylation are needed in the present GBM series.

***ID4* hyperexpression is driven by mutated *TP53* in AGII**

Here we demonstrate a significant difference in *ID4* expression between AGII cases harboring *TP53* mutation versus wild-type, mutated cases showing significant increase in *ID4* expression. Other studies in breast cancer models have demonstrated *in vitro* *ID4* up-regulation driven by the mutated p53 protein [13], [14]. *TP53* mutations, present in 50% of AGII cases, are considered one of the earliest events in astrocytoma formation [9]. The significant association shown here between *TP53* mutation and *ID4* expression could possibly classify *ID4* hyperexpression as an early event in astrocytoma formation. The analysis of AGII patients OS time in *TP53* mutated and wild-type cases showed that the mutated cases had a shorter survival by eleven months in comparison to the wild-type group. Considering the low number of cases, further studies are necessary to confirm statistically this result. The great majority of *TP53* mutations are missense, localized in specific gene domains (“*hot spots*”) that do not inactivate protein function. On the contrary, these alterations stabilize the mutated protein and enhance its oncogenic activity by increasing the transcription of target genes, recruiting other transcription factors and co-factors (recently reviewed in [35]). However, no difference of the analyzed gene expressions were found compared to the different types of *TP53* mutation in the current AGII series, and it remains to be elucidated if the cases harboring inactivating nonsense mutations present alternative activation for *ID4*, *SOX2* and *SOX4*.

Associated expression of *ID4* with *SOX2* and *SOX4* and with mutated *TP53*

SOX2 also proved to be significantly augmented and correlated to *ID4* in *TP53* mutated AGII cases. *SOX2* overexpression driven by inactivation of p53 in mouse embryonic fibroblasts has been demonstrated [36], although the mechanism remains unknown. One possible explanation is that *ID4* up-regulation activates *SOX2* through inhibition of a microRNA, mir-9*, which is a direct negative regulator of *SOX2*, as shown in glioma cell lines [16]. Our findings of *ID4* up-regulation associated to *TP53* mutated status and to *SOX2* hyperexpression in human astrocytoma specimens corroborate these previous observations in cell lines. Taken together, these data suggest that *ID4* and *SOX2* act jointly post-*TP53* mutation in promoting astrocytoma tumorigenesis.

The association between SOX4 and p53 has also been reported [37], [38], with SOX4 stabilizing p53 protein and inhibiting its induction of the apoptotic pathway. In our study, *SOX4* expression was increased in *TP53* mutated cases, in a similar pattern to *ID4*. It remains to be elucidated what role the observed association between *SOX4* and mutated *TP53* plays in the process of astrocytic tumor formation.

Our results showed a significant increase in *NANOG* expression in *TP53* mutated AGII cases. It is known that p53 is a direct negative regulator of *NANOG* [39] and that the absence of a functional p53 protein augments *NANOG* expression. *NANOG* levels did not correlate to any of the other analyzed targets, and its expression pattern in GBM cases was random, enabling us to speculate that *NANOG* works differently to contribute to astrocytoma formation. *CD133* levels were not significantly different when *TP53* mutated and wild-type AGII cases were compared, and GBM cases also displayed a random pattern, suggesting that *CD133* also works differently in the tumorigenic process of astrocytomas.

OCT-4 relative expression was not influenced by *TP53* mutational status and did not correlate with *ID4* expression in AGII cases. However, the expression pattern of GBM cases was strikingly different: secondary GBM exhibited very low *OCT-4* mRNA levels in comparison to primary GBM. Together with the positive correlation between *OCT-4* and *ID4* found in both AGIII and GBM cases, these data indicate a role for this target in the most malignant grades of astrocytoma. These results prompted us to further investigate the combined expression of *ID4*, *SOX4* and *OCT-4*.

Impact of *ID4*, *SOX4* and *OCT-4* mutual hyperexpression on primary GBM patients' overall survival

The expression level variability among GBM cases was present for all analyzed genes (Figure 1), with some cases exhibiting very high mRNA levels in contrast to low levels found in others. Again, this phenomenon may be due to the extensive heterogeneity found in GBM at both the cellular and molecular levels [40], contributing to difficulties in eradicating these tumors. Thus, we believed it was necessary to ascertain whether patients bearing tumors with higher mRNA levels of the analyzed genes showed worse overall survival. When we grouped *ID4*, *SOX4*

and *OCT-4* together, patients hyperexpressing these genes exhibited much lower survival time. In bladder cancers, both *ID4* and *SOX4* were amplified and overexpressed heterogeneously [41], similar to astrocytomas, and contributed to the variable biological and clinical behavior of the tumors. As previously mentioned, *OCT-4* and *SOX4* proteins form a transcription complex and induce *SOX2* expression, increasing the tumorigenicity of glioma cells. Although decreased survival was demonstrated in mice inoculated with GBM cells hyperexpressing *OCT-4*, we observed that *OCT-4* alone had no impact on our patients' overall survival (Figure S1D). Because *ID4* alone, as well as the *SOX4* and *OCT-4* complex, activates *SOX2*, and because chemoresistance is associated with both *SOX2* and *ID4* augmented expression, it is possible to speculate that multiple *SOX2* activation events in GBM may impair patient prognosis. *SOX2* and *OCT-4*, are considered masters of pluripotency in embryonic stem cells [42]. This role is maintained in cancer stem cells (CSC), a subset of tumor cells regarded as possessing traits such as therapeutic resistance, tumor angiogenesis and recurrence [43]. *ID4* has also shown to play an important role in CSC biology, its expression being imperative to the formation and maintenance of CSC population [44]. In GBM stem cells [45]–[48], *ID4* has been postulated as an important target in the dedifferentiation process, as shown in the *in vitro* reports [15], [16]. Moreover, the re-expression of embryonic stem cells genes in tumors, including gliomas, has been associated with a more aggressive phenotype [22], [49], [50]. It is possible that this is the cause for the worse clinical end-point of overall survival among GBM patients found in our study. However, because of the low number of GBM cases (n=25) in which this finding was demonstrated, the present result should be validated in an independent study sample containing a higher number of GBM patients.

In this scenario, *ID4* seems to be a promising target for further studies in order to better understand its role in tumorigenesis and its potential use in therapeutics.

Supporting Information Legends

Figure S1: Kaplan-Meier curves of GBM patients according to relative expression levels of *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *ID4xSOX2*, *ID4xSOX4*, *ID4xOCT-4*, *SOX4xOCT-4* (TIF).

Table S1: Clinical data of patients in the study (Excel).

Table S2: Low-grade astrocytoma patients' survival time analysis (Word).

Acknowledgments

We sincerely thank the doctors and residents of the Discipline of Neurosurgery of the Department of Neurology at Hospital das Clínicas of School of Medicine, University of São Paulo, for the therapeutic and diagnostic procedures of all patients included in this study, and the doctors and technicians at the Division of Pathological Anatomy of the same institution for the WHO grade classification of tumor samples and tissue section processing. We also thank the Psychiatry Institute for the logistic help in the surgical therapy.

Figure legends

Figure 1: Expression levels of genes in diffusely infiltrative astrocytomas (AGII to GBM). Transcript levels of *ID4* (A), *SOX2* (B), *SOX4* (C), *OCT-4* (D), *NANOG* (E) and *CD133* (F) were determined in 26 low-grade astrocytomas (AGII), 18 anaplastic astrocytomas (AGIII) and 86 GBM cases relative to 22 non-neoplastic (NN) by quantitative real-time PCR. Relative expression values were calculated based on the geometric mean of *HPRT*, *GUSB* and *TBP* expression levels of each sample and non-neoplastic brain values. The following equations were applied to calculate gene relative expression according to primer efficiency (E) in tumor samples *versus* the mean of non-neoplastic tissues: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [27] for *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4* and *CD133*; and $1+E^{-\Delta\Delta Ct}$ [28] for *ID4* and *NANOG*, where $\Delta Ct = Ct \text{ specific gene} - \text{mean } Ct \text{ of housekeeping genes}$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tumor} - \text{mean } \Delta Ct \text{ non-neoplastic}$. Red dots represent the secondary GBM cases. Horizontal bars show the median of each group and the values are presented in Table 2. *NANOG* expression in 15 NN and 40 GBM cases was very low and, as a result, the horizontal bar for NN does not appear in the graphic (median=0). The difference of relative gene expressions among the groups were statistically significant ($p<0.0005$ for *ID4*, *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4* and *NANOG*; and $p<0.05$ for *CD133*, Kruskal-Wallis test). A pair-based comparison was assessed using Dunn test. The p value results are shown, where *** $p<0.0005$, ** $p<0.005$ and * $p<0.05$.

Figure 2: Correlation between *ID4* and *SOX2*, *SOX4*, *OCT-4*, *NANOG* and *CD133* expression levels in diffusely infiltrative astrocytomas. Correlation was assessed in AGII (A, D, G, J, M), AGIII (B, E, H, K, N) and GBM (C, F, I, L, O) cases. *ID4* expression level was correlated to *SOX2* (A-C), *SOX4* (D-F), *OCT-4* (G-I), *NANOG* (J-L) and *CD133* (M-O) expression levels. The significant correlations are shown in black and the non-significant in grey. r correlation coefficient assessed by Spearman-rho test, and r^* by Pearson's correlation test.

Figure 3: Comparison of gene expression levels between the wild-type *TP53* (WT *TP53*) and the mutated *TP53* (Mutated *TP53*) in AGII cases. Higher expressions of *ID4* (A), *SOX2* (B), *SOX4* (C) and *NANOG* (E) were observed on the mutated *TP53* AGII cases. No difference was found for *OCT-4* (D) and *CD133* (F) relative expression between the two groups. White lozenges represent the deceased patients. The *p* values are: **p* < 0.05 and ** *p* < 0.005, Mann-Whitney test.

Figure 4: *ID4*, *SOX2* and *SOX4* immunohistochemistry. Representative cases of wild-type *TP53* AGII (A-C), mutated *TP53* AGII (D-F), primary GBM (G-I) and secondary GBM (J-L) stained for *ID4*, *SOX2* and *SOX4* are demonstrated. Both mutated AGII and secondary GBM cases showed stronger and larger number of nuclear stained cells (score 3 for intensity and $\geq 75\%$ of positive cells) for *ID4*, *SOX2* and *SOX4*. Comparatively, wild-type *TP53* AGII and primary GBM presented score 1 for intensity and < 25% of positive cells. The reaction was performed in paraffin embedded tissue sections with a commercial polymer kit (Novolink; Novocastra, UK), using diaminobenzidine as developer and Harris hematoxylin for nuclear counterstaining. 200x magnification for all images.

Figure 5: Heatmap displaying the relative gene expressions in low-grade astrocytoma (AGII), anaplastic astrocytoma (AGIII) and GBM cases according to *TP53* mutation status. The *TP53* mutated cases are represented by side dashes. The mutated *TP53* AGII cases showed more elevated expression levels of *ID4*, *SOX2*, *SOX4* and *NANOG*. *CD133* expressions were more heterogeneous among the cases. *SOX2* and *SOX4* showed similar expression levels to *ID4*. Similarly, secondary GBM cases also presented higher *ID4*, *SOX2*, *SOX4* expression levels. *OCT-4*, *NANOG* and *CD133* expression levels were heterogeneous among secondary GBM cases, and *OCT-4* presented higher mRNA levels in primary GBM.

Figure 6: Survival curve of GBM patients. Twenty-five GBM cases out of 86 GBM cases presented concomitant high or low *ID4*, *SOX4* and *OCT-4* relative expression levels (12 GBM cases presenting high expressions and 13 low expressions for the three genes). The survival time difference between the two groups was statistically significant (*log rank p-value*=0.014), presenting median survival time of 6 months for GBM cases presenting concomitant high expressions for the three genes compared to 18 months for GBM cases with low expressions.

Tables

Table 1. Demographic data from patients analyzed in this study

Total of cases	Morphology^a	Mean age at diagnosis (years)^b	Gender^c
22	NN	38±7.6	12F, 10M
26	AGII	34±8.1	11F, 15M
18	AGIII	35±12.3	7F, 11M
86	GBM	54±13.9	28F, 58M

^aNN, non-neoplastic; AGII, low-grade astrocytoma; AGIII, anaplastic astrocytoma; GBM, glioblastoma

^bAge at diagnosis was calculated from date of birth to date of surgery

^cM, male; F, female

Table 2. Median of relative expression levels of the analyzed genes in astrocytomas, according to morphology

Morphology^a	ID4	SOX2	SOX4	OCT-4	NANOG	CD133
NN	1.15	1.06	1.09	0.51	0	0.87
AGII	8.12	3.32	9.12	2.92	1.77	1
AGIII	11.1	4.9	8.86	4	3.84	2.43
GBM	1.89	2.32	7.63	1.79	0.25	2.26

^aNN, non-neoplastic; AGII, low-grade astrocytoma; AGIII, anaplastic astrocytoma; GBM, glioblastoma

FIGURES

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

References

1. Benezra R, Davis RL, Lassar A, Tapscott S, Thayer M, et al. (1990) Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 599: 1–11.
2. Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61: 49–59.
3. Iavarone A, Lasorella A (2004) Id proteins in neural cancer. *Cancer Lett* 204: 189–196.
4. Perk J, Iavarone A, Benezra R (2005) Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat rev Cancer* 5: 603–614.
5. Iavarone A, Lasorella A (2006) ID proteins as targets in cancer and tools in neurobiology. *Trends Mol Med* 12: 588–594.
6. Norton JD (2000) ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113: 3897–3905.
7. Yun K, Mantani A, Garel S, Rubenstein J, Israel MA (2004) Id4 regulates neural progenitor proliferation and differentiation in vivo. *Development* 131: 5441–5448.
8. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97–109.
9. Ohgaki H, Kleihues P (2011) Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol* 28: 177–183.
10. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19:764-772.
11. Kuzontkoski PM, Mulligan-Kehoe MJ, Harris BT, Israel MA (2010) Inhibitor of DNA binding-4 promotes angiogenesis and growth of glioblastoma multiforme by elevating matrix GLA levels. *Oncogene* 29: 3793–3802.
12. Zeng W, Rushing EJ, Hartmann DP, Azumi N (2010) Increased inhibitor of differentiation 4 (id4) expression in glioblastoma: a tissue microarray study. *J Cancer* 1: 1–5.
13. Dell'Orso S, Ganci F, Strano S, Blandino G, Fontemaggi G (2010) ID4: a new player in the cancer arena. *Oncotarget* 1: 48–58.
14. Fontemaggi G, Dell'Orso S, Trisciuglio D, Shay T, Melucci E, et al. (2009) The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1086–1093.

15. Jeon H-M, Jin X, Lee J-S, Oh S-Y, Sohn Y-W, et al. (2008) Inhibitor of differentiation 4 drives brain tumor-initiating cell genesis through cyclin E and notch signaling. *Genes Dev* 22: 2028–2033.
16. Jeon H-M, Sohn Y-W, Oh S-Y, Oh S-Y, Kim S-H, et al. (2011) ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9*-mediated suppression of SOX2. *Cancer Res* 71: 3410–3421.
17. Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, et al. (2011) Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J Biol Chem* 286: 41434–41441.
18. Lin B, Madan A, Yoon J-G, Fang X, Yan X, et al. (2010) Massively parallel signature sequencing and bioinformatics analysis identifies up-regulation of TGFBI and SOX4 in human glioblastoma. *PLoS ONE* 5: e10210.
19. Boiani M, Schöler HR (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 872–884.
20. Chambers I, Tomlinson SR (2009) The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* 136: 2311–2322.
21. Qu Q, Shi Y (2009) Neural stem cells in the developing and adult brains. *J Cell Physiol* 221: 5–9.
22. Holmberg J, He X, Peredo I, Orrego A, Hesselager G, et al. (2011) Activation of neural and pluripotent stem cell signatures correlates with increased malignancy in human glioma. *PLoS One* 6: e18454.
23. Ma Y-H, Mentlein R, Knerlich F, Kruse M-L, Mehdorn HM, et al. (2008) Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol* 86: 31–45.
24. Marie SKN, Okamoto OK, Uno M, Hasegawa APG, Oba-Shinjo SM, et al. (2008) Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int J Cancer* 122: 807–815.
25. Oba-Shinjo SM, Bengtson MH, Winnischofer SMB, Colin C, Vedoy CG, et al. (2005) Identification of novel differentially expressed genes in human astrocytomas by cDNA representational difference analysis. *Mol Brain Res* 140: 25–33.
26. Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, et al. (2009) Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol* 10: 17.
27. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method 25: 402–408.
28. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.

29. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
30. Uno M, Oba-Shinjo SM, De Aguiar PH, Leite CC, Rosemberg S, et al. (2005) Detection of somatic TP53 splice site mutations in diffuse astrocytomas. *Cancer Lett* 224: 321–327.
31. Uno M, Oba-Shinjo SM, Wakamatsu A, Huang N, Ferreira Alves VA, et al. (2006) Association of TP53 mutation, p53 overexpression, and p53 codon 72 polymorphism with susceptibility to apoptosis in adult patients with diffuse astrocytomas. *Int J Biol Markers* 21: 50–57.
32. Vandeputte DAA, Troost D, Leenstra S, Ijlst-Keizers H, Ramkema M, et al. (2002) Expression and distribution of id helix-loop-helix proteins in human astrocytic tumors. *Glia* 38: 329–338.
33. Uno M, Oba-Shinjo SM, Camargo AA, Moura RP, Aguiar PH de, et al. (2011) Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. *Clinics* 66: 1747–1755.
34. Martini M, Cenci T, D'Alessandris GQ, Cesarini V, Cocomazzi A, et al. (2012) Epigenetic silencing of Id4 identifies a glioblastoma subgroup with a better prognosis as a consequence of an inhibition of angiogenesis. *Cancer*. doi:10.1002/cncr.27821.
35. Freed-Pastor WA, Prives C (2012) Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* 26: 1268–1286.
36. Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, et al. (2009) Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460: 1140–1144.
37. Hur W, Rhim H, Jung CK, Kim JD, Bae SH, et al. (2010) SOX4 overexpression regulates the p53-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma: clinical implication and functional analysis in vitro. *Carcinogenesis* 31: 1298–1307.
38. Pan X, Zhao J, Zhang W-N, Li H-Y, Mu R, et al. (2009) Induction of SOX4 by DNA damage is critical for p53 stabilization and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3788–3793.
39. Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, et al. (2005) p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 7: 165–171.
40. Bonavia R, Inda M-M, Cavenee WK, Furnari FB (2011) Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. *Cancer Res* 71: 4055–4060.
41. Wu Q, Hoffmann MJ, Hartmann FH, Schulz WA (2005) Amplification and overexpression of the ID4 gene at 6p22.3 in bladder cancer. *Mol Cancer* 4: 16.

42. Mallanna SK, Rizzino A (2012) Systems biology provides new insights into the molecular mechanisms that control the fate of embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 227: 27–34.
43. Sampieri K, Fodde R (2012) Cancer stem cells and metastasis. *Semin Cancer Biol* 22: 187–193.
44. Park S-J, Kim R-J, Nam J-S (2011) Inhibitor of DNA-binding 4 contributes to the maintenance and expansion of cancer stem cells in 4T1 mouse mammary cancer cell line. *Lab Anim Res* 27: 333–338.
45. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, et al. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821–5828.
46. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, et al. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396–401.
47. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, et al. (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23: 9392–9400.
48. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, et al. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64: 7011–7021.
49. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, et al. (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40: 499–507.
50. Guo Y, Liu S, Wang P, Zhao S, Wang F, et al. (2011) Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* 59: 763–775.