The background features a decorative graphic consisting of three overlapping blue circles of varying sizes, arranged in a vertical line. Two thin blue lines intersect at the top left and extend diagonally across the page, framing the central text. The circles are composed of concentric layers of different shades of blue, creating a 3D effect.

***Identificação de alterações
moleculares associadas à
expressão de CD133,
CXCR4, CD44 e OLIG2 e ao
padrão de metilação em
promotor de CDKN2A em
tumores astrocíticos***

Markênia Kélia Santos Alves

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARKÊNIA KÉLIA SANTOS ALVES

**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS À
EXPRESSÃO DE *CD133*, *CXCR4*, *CD44* E *OLIG2* E AO PADRÃO DE METILAÇÃO
EM PROMOTOR DE *CDKN2A* EM TUMORES ASTROCÍTICOS**

Fortaleza/CE

2014

Markênia Kélia Santos Alves

**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS À
EXPRESSÃO DE CD133, CXCR4, CD44 E OLIG2 E AO PADRÃO DE METILAÇÃO
EM PROMOTOR DE CDKN2A EM TUMORES ASTROCÍTICOS**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia em Saúde.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora:

Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst

Fortaleza/CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- A48i Alves, Markênia Kélia Santos.
Identificação de alterações moleculares associadas à expressão de cd133, cxcr4, cd44 e olig2 e ao padrão de metilação em promotor de *cdkn2a* em tumores astrocíticos. / Markênia Kélia Santos Alves. – 2014.
87 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Tese (doutorado). – Universidade Federal do Ceará, Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Doutorado em Biotecnologia em Saúde, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.
Orientação: Profa. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst.
1. Células-Tronco. 2. Metilação. 3. Antígenos CD44. 4. Receptores CXCR4. 5. Genes p16.
I. Título.
-

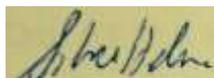
Markênia Kélia Santos Alves

Identificação de alterações moleculares associadas à expressão de CD133, CXCR4, CD44 e OLIG2 e ao padrão de metilação em promotor de CDKN2A em tumores astrocíticos

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia em saúde.

Aprovada em: 05/09/2014

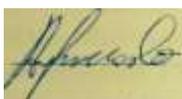
BANCA EXAMINADORA



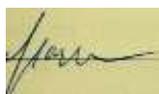
Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Rommel Rodríguez Burbano
Universidade Federal do Pará (UFPA)



Prof. Dr. José Arnaldo Motta de Arruda
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Alba Fabíola Costa Torres
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*A minha FAMÍLIA, que é
e sempre será, minha
fonte inspiradora e de
força.*

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto desenvolver este trabalho e escrever esta tese, foi utilizar apenas duas páginas para agradecer as pessoas que fizeram parte desta trajetória de sete anos no laboratório de Genética e Molecular (LABGEM) da faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Início os agradecimentos a Deus, que em tantos momentos desesperadores, carregou-me no colo, não permitindo que eu me afastasse de meu propósito, além de sempre conceder-me sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar e força para não desistir e persistir.

Agradeço a todos os pacientes que, embora no anonimato, prestaram uma contribuição fundamental para que este estudo fosse possível e para o avanço da investigação científica nesta área do conhecimento.

A professora doutora Silvia Helena Barem Rabenhorst, minha orientadora. Antes de mais, agradeço a generosidade com que me distinguiu, ao partilhar comigo um desejo investigacional seu, bem como a grande confiança que depositou em mim para o concretizar, no âmbito do meu plano de estudos do doutorado. Ter sido orientanda sua foi uma oportunidade, não só para confirmar a valia do seu conhecimento teórico e metodológico, mas inclusivamente para me surpreender com a dimensão dos seus conhecimentos e o domínio que detém do campo de estudo da oncologia e biologia molecular. Mas o gosto maior, e o correspondente maior agradecimento, reside na sua atitude para comigo, oferecendo-me palavras de incentivo, acolhimento, compreensão e liberdade para realizar a minha pesquisa e quando necessário, sua disponibilidade inquestionável para desbloquear com segurança e agilidade as minhas ignorâncias, dúvidas e angústias. Para mim, a sua orientação foi uma oportunidade de enriquecimento pessoal durante esses anos.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo suporte financeiro.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, pelo apoio a formação científica de seus pós-graduandos.

Aos patologistas Cleto Dantas Nogueira e Régia Maria do Socorro Vidal do Patrocínio, pela colaboração inestimável nas análises histológicas e imunohistoquímicas.

Ao professor doutor Rommel Burbano, pelo acolhimento em seu laboratório, na Universidade Federal do Pará, e pelas análises e ensinamentos valiosos a respeito da técnica de FISH.

Aos doutores Sérgio de Sá Leitão P. Júnior e Valdir de Queiroz Balbino, da Universidade Federal de Pernambuco, pela contribuição na realização das análises estatísticas.

Aos membros da banca examinadora, pela prontidão e disponibilidade em participar da finalização deste trabalho, com contribuições e sugestões importantes e enriquecedoras.

A técnica de laboratório Maria do Céu do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da UFC, e ao bolsista Josiel, do LABGEM, pela disponibilidade e preparação, com qualidade, dos cortes histológicos e colorações.

As minhas grandes e inesquecíveis amigas Valeska Portela Lima e Isabelle Joyce de Lima Silva Fernandes... *“Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só” Amir Klink...* Obrigada por fazerem parte dos melhores momentos desta jornada!

Aos amigos do laboratório LABGEM, pela convivência ímpar durante esses anos... Possuir amigos que pensam de formas tão distintas e são tão diferentes, enriqueceu significativamente a minha formação. Agradeço a enorme diversidade que me rodeia, que me ajuda a captar diferentes olhares sobre a mesma realidade.

Ao colega Eduardo Henrique, pela contribuição na realização da técnica de PCR específica para metilação para o gene *CDKN2A* e pela tradução do inglês.

Ao meu querido Paulo Vinicius Frota Martins... *“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso” Charles Chaplin...* E foi assim! Não nos encontramos por acaso e a sua presença em minha vida trouxe a paz, alegria e apoio que preciso para ser feliz e chegar ao fim dessa etapa e de muitas outras...

Aos meus pais, José Solon Alves e Maria Cléa Santos Alves, e aos meus irmãos, Marclesson Santos Alves e Marlus Santos Alves. Obrigada pelo apoio incondicional a longo deste processo de pós-graduação (mestrado e doutorado) e de muitos outros. Vocês são minha fortaleza e são o melhor da minha vida. Em especial aos meus pais, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram aos seus filhos a oportunidade de realizar sonhos e conquistas.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a concentração deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

"Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular – é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda!"

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Tumores são populações celulares heterogêneas hierarquicamente organizadas, cujas células-tronco possuem importância relevante desde que são células com a capacidade de se renovarem e de gerarem linhagens em fases diferentes. Dada a sua importância, a identificação de componentes de células-tronco é essencial para o entendimento da tumorigênese. Apesar de marcadores de linhagem neural terem sido identificados, a associação destes marcadores com os tumores cerebrais ainda é escassa e nos astrocitomas são relacionados principalmente aos glioblastomas. Entre esses marcadores de células-tronco, CD133, CXCR4 e CD44 são relacionados à formação do glioma, migração e crescimento; por outro lado, OLIG2 é envolvido no destino celular. Não existem estudos, até essa data, que avaliam todos esses marcadores juntos e sua relação com grau tumoral. Adicionalmente, alterações epigenéticas específicas, especialmente a metilação em promotor, tem sido identificadas nestes tumores, levando a inativação de genes, com destaque o *CDKN2A* (proteína p16^{INK4A}), um supressor tumoral. Apesar de esse mecanismo ser apontado como o principal inativador desse gene, em astrocitomas ainda existem questões controversas. Para avaliar essas questões, este estudo objetivou determinar a expressão e padrão de metilação em promotor de *CDKN2A* e sua associação com parâmetros clínico-patológicos e se a presença de células-tronco/progenitoras, considerando a expressão de CD133, CXCR4, CD44 e OLIG2 poderia definir subpopulações de células que podem ser usadas como marcadores prognósticos. Para isso, em uma série de 93 astrocitomas de diferentes graus de malignidade, foram estudadas a expressão dos marcadores CD133, CXCR4, CD44, OLIG2 e p16^{INK4A}, detectada pela técnica de imunohistoquímica, e o padrão de metilação em promotor de *CDKN2A*, por PCR específico para metilação (PCR-MS). Os dados foram então associados com grau tumoral, localização e outros parâmetros clínico-patológicos. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste do X², teste exato de Fisher, correlação de Spearman, agrupamento de k-means e análise de componentes principais, com diferenças consideradas significantes com p<0.05. A imunomarcagem de OLIG2 mostrou a frequência maior de positividade (73,1%), seguido por CXCR4 (60,2%), CD44 (55,9%) e CD133 (45,2%). Análises de correlação e agrupamento definiram dois subtipos de população de acordo com os marcadores estudados, um subtipo CXCR4(+)/CD133(+)/CD44(+) e outro OLIG2(+). Tumores CD133, CXCR4 e CD44 positivos aumentaram de acordo com malignidade. No grau IV, este subtipo de tumores [CD133(+)/CXCR4(+)/CD44(+)] foi significativamente mais frequente (p=0,008) e também nos tumores difusos. Adicionalmente, tumores com CXCR4(+) e CD133(+) foram preferencialmente localizados nos hemisférios cerebrais e nos ventrículos, e a maioria nos pacientes com idade ≥ 30 anos. Por outro lado, tumores OLIG2(+) foram associados com o cerebelo, que é a localização preferencial do astrocitoma pilocítico. Uma forte correlação negativa entre imunomarcagem nuclear e citoplasmática e metilação em promotor de *CDKN2A* foi encontrada. Além do mais, uma correlação negativa significativa entre metilação em promotor de *CDKN2A* e idade foi observada e pacientes do sexo feminino tiveram uma maior frequência significativa de *CDKN2A* metilado em promotor que o sexo masculino. Em conclusão, a presença de subpopulações de células-tronco em astrocitomas é indicativa de progressão tumoral, cujos marcadores CXCR4, CD133 e CD44 podem ser potencialmente usados em conjunto como marcadores prognósticos. A associação com localização do tumor e idade também corroboram esses achados. Adicionalmente, a inativação de *CDKN2A* por metilação em promotor é um evento frequente em astrocitomas e é relacionada à idade e sexo dos pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: Astrocitomas, células-tronco, metilação, CD133, CXCR4, CD44, OLIG2, p16.

ABSTRACT

Currently, the concept that tumors are cell populations organized in a hierarchically heterogenous way in which stem-cells are relevantly important as these cells have the capacity of self-renew and of generating cell lineages in different phases of differentiation. So that, the identification of stem-cell components is essential to tumorigenesis understanding. Although neural cell lineage markers have been identified, the association among these markers and neurological tumors is still scarce, and taking in consideration the astrocytomas, the association assessments are verified mainly regarding the glioblastomas. Among these stem cell markers, CD133, CXCR4 and CD44 are related to the glioma formation, migration and growth; on the other hand, OLIG2 is involved in cell destination. So far there are no studies evaluating all these markers together and their relationship to tumor grades. Additionally, specific epigenetic alterations, specially promoter methylation, have been widely identified in these tumors, leading to gene inactivation, mostly involving *CDKN2A* (p16^{INK4A} protein), a tumor suppressor. Although this mechanism is pointed as this gene main inactivator, there are still controvertial questions regarding the astrocytomas. In order to evaluate these questions, the present study aimed to determine *CDKN2A* pattern of methylation and expression and their association to clinicalpathological parameters, and if the presence of progenitor/stem-cells, taking CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 expression in consideration, could define subpopulations of cells which might be used as prognostic markers. So, in a series of 93 astrocytomas of different malignity grades, the expression of CD133, CXCR4, CD44, OLIG2 and p16^{INK4A} was analysed by the imunohistochemistry technique, and the *CDKN2A* methylation status was assessed by methylation specific PCR (MS-PCR). The data was then associated to tumor grades, localization and other clinicalpathological parameters. The statistic analyses were made using X² test, Fisher's exact test, Spearman's correlation, k-means groupment and principal component analyses, using p<0.05 as statistically significance. The imunopositivity of OLIG2 was predominant (73.1%), followed by CXCR4 (60.2%), CD44 (55.9%) and CD133 (45.2%). The correlation and groupment analyses defined two different population subtypes, a CXCR4(+)CD133(+)CD44(+) subtype and a OLIG2(+) subtype. CXCR4(+)CD133(+)CD44(+) tumors became more frequent as malignity grew. In grade IV, this subtype was significantly more frequent (p=0.008), being also in diffuse tumors. Additionally, CXCR4(+) and CD133(+) tumors were preferentially located in brain hemisferes and in the ventricles, and mostly in aged >30 patients. On the other side, OLIG2(+) tumors were associated to the cerebellum, which is the pylocitic tumor preferential localization. A strong negative correlation between nuclear and cytoplasmatic imunopositivity and promoter methylation in *CDKN2A* was observed. Also, a negative significant correlation between methylated *CDKN2A* and patient's age was found; moreover, feminine patients presented a higher frequency of methylated *CDKN2A*. In conclusion, the presence of stem-cell subpopulations in astrocytomas indicates tumoral progression, in which CXCR4, CD133 and CD44 may be potentially used together as prognostic markers. The association between tumor localization and patient's age also corroborates these findings. Additionally, the *CDKN2A* inactivation by promoter methylation is a frequent event in astrocytomas and it is associated to patient's age and gender.

KEYWORDS: Astrocytomas, stem-cells, methylation, CD133, CXCR4, CD44, OLIG2, p16.

SUMÁRIO

I	REVISÃO DE LITERATURA	16
1	Anatomia básica do Sistema Nervoso Central (SNC)	16
2	Tumores do SNC	17
	2.1 Epidemiologia	17
	2.2 Fatores de risco	19
	2.3 Classificação histopatológica dos tumores do SNC e graduação	20
3	Astrocitomas	23
	3.1 Caracterização dos astrocitomas	23
	a) Astrocitomas de grau I	23
	b) Astrocitomas difusos (grau II a IV)	24
	Astrocitoma de grau II	24
	Astrocitoma de grau III	25
	Astrocitoma de grau IV	28
	3.2 Diagnóstico	30
	3.2.1 Sinais e sintomas	30
	3.2.2 Técnicas neuroradiológicas gerais	31
	3.2.3 Exames laboratoriais	31
	3.3 Tratamento	32
4	Origem celular dos tumores astrocíticos	33
	4.1 Definição de células-tronco e progenitoras	34
	4.2 Células-tronco e neurogênese	35

	4.3 Células-tronco/progenitoras e câncer	36
5	Marcadores de células-tronco/progenitoras	37
	5.1 CD133	37
	5.2 CXCR4	39
	5.3 CD44	41
	5.4 OLIG2	44
II	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	48
III	OBJETIVOS	49
IV	REFERÊNCIAS	50
V	ANEXOS	60
	ARTIGO 1: <i>CDKN2A</i> promoter hypermethylation in astrocytomas is associated with age and sex	60
	ARTIGO 2: Differential expression of <i>CD133</i> , <i>CXCR4</i> , <i>CD44</i> and <i>OLIG2</i> according to tumor grade in astrocytomas	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais porções do sistema nervoso	16
Figura 2	Principais componentes do sistema nervoso central	17
Figura 3	Taxas brutas de incidência das localizações primárias dos tumores do SNC estimadas para 2014, em homens e mulheres no Brasil	18
Figura 4	Estimativa do número de casos novos, segundo o sexo, na região Nordeste, em 2014	19
Figura 5	Frequências dos principais tumores do SNC	21
Figura 6	Células da glia do SNC	21
Figura 7	Representação esquemática do locus <i>INK4a/ARF/INK4b</i>	26
Figura 8	Ponto de atuação da proteína p16 no ciclo celular	26
Figura 9	Representação esquemática da conversão da citosina em 5-metilcitosina catalisada pela DNA metil-transferase	27
Figura 10	Mecanismo de repressão transcricional mediado por metilação do DNA	28
Figura 11	Principais alterações genéticas envolvidas na progressão dos astrocitomas	30
Figura 12	Representação esquemática da possível origem celular do tumor do cérebro	34
Figura 13	Locais da neurogênese no SNC	36
Figura 14	Hierarquia celular neuroglial	36
Figura 15	Representação estrutural da proteína CD133	38
Figura 16	Modelo hipotético da via de sinalização CD133/PI3K/Akt regulando o comportamento de células-tronco em gliomas	39
Figura 17	Representação estrutural do receptor CXCR4	40
Figura 18	Esquema das vias de sinalização intracelulares de CXCR4	41
Figura 19	Esquema simplificado da estrutura do gene <i>CD44</i>	42
Figura 20	Estrutura da proteína CD44	43

Figura 21	Vias de sinalização de CD44 no câncer	44
Figura 22	Funções de OLIG1 e OLIG2 no desenvolvimento do SN	45
Figura 23	Diferenciação do oligodendrócito	46
Figura 24	Modelo de especificação celular na zona subventricular, mostrando a atuação de OLIG2 na repressão do fenótipo neuronal e promoção de glioblastos	46
Figura 25	Mecanismo de atuação do OLIG2 em gliomas, segundo LIGON et al., 2007	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	A classificação parcial dos tumores do SNC de origem neuroepitelial, segundo OMS	22
----------	--	----

I - REVISÃO DE LITERATURA

1 – ANATOMIA BÁSICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

O sistema nervoso (SN) é dividido em duas partes fundamentais, o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é a porção de recepção de estímulos, de comando e desencadeadora de respostas, sendo formado pelo encéfalo e pela medula espinal, protegidos, respectivamente, pelo crânio e pela coluna vertebral. Esta proteção é reforçada pela presença de lâminas de tecido conjuntivo, chamadas meninges (Figura 1 e Figura 2A). O encéfalo é dividido em cérebro, cerebelo e tronco encefálico, este último formado por mesencéfalo, ponte (protuberância) e bulbo (Figura 2B). A maior parte do encéfalo corresponde ao cérebro constituído pelos hemisférios cerebrais, que podem ser divididos em lobos, correspondendo cada um aos ossos do crânio com que guardam relações, existindo, portanto, os lobos frontal, occipital, temporal, parietal e da ínsula (Figura 2C). Entre os hemisférios, estão os ventrículos, que se dividem em quatro, dois ventrículos laterais, o terceiro ventrículo e o quarto ventrículo, que são reservatórios do líquido ou líquido cefalorraquidiano, que participa da nutrição, proteção e excreção do sistema nervoso. Ao redor dos ventrículos laterais está a zona subventricular (ZSV), que reside um *pool* de células-tronco envolvidas com o processo de neurogênese. A porção periférica do SN é constituída pelas vias que conduzem os estímulos ao SNC ou que levam até aos órgãos efetadores as ordens emanadas da porção central, sendo formado pelos nervos cranianos e espinais, pelos gânglios e pelas terminações nervosas (Figura 1) (MACHADO, 2000).

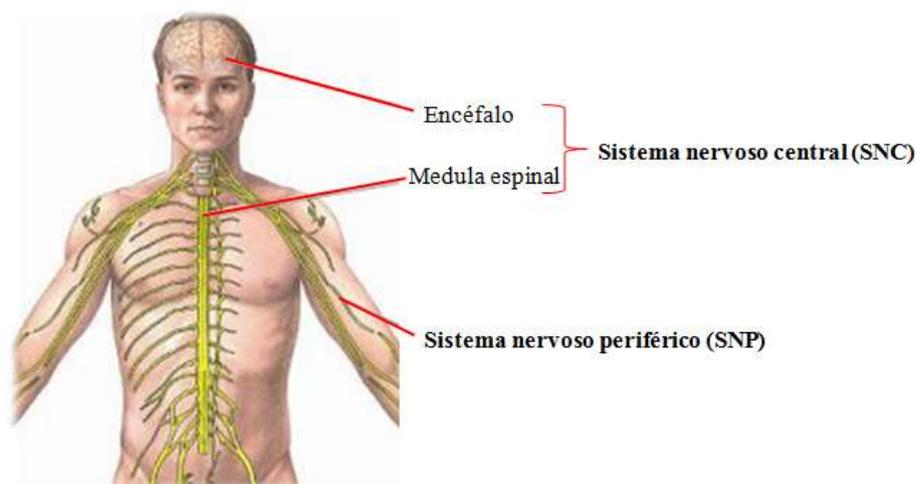


Figura 1 – Principais porções do sistema nervoso.

Fonte: Disponível em: <http://www.minhavidade.com.br/saude/temas/esclerose-multipla>

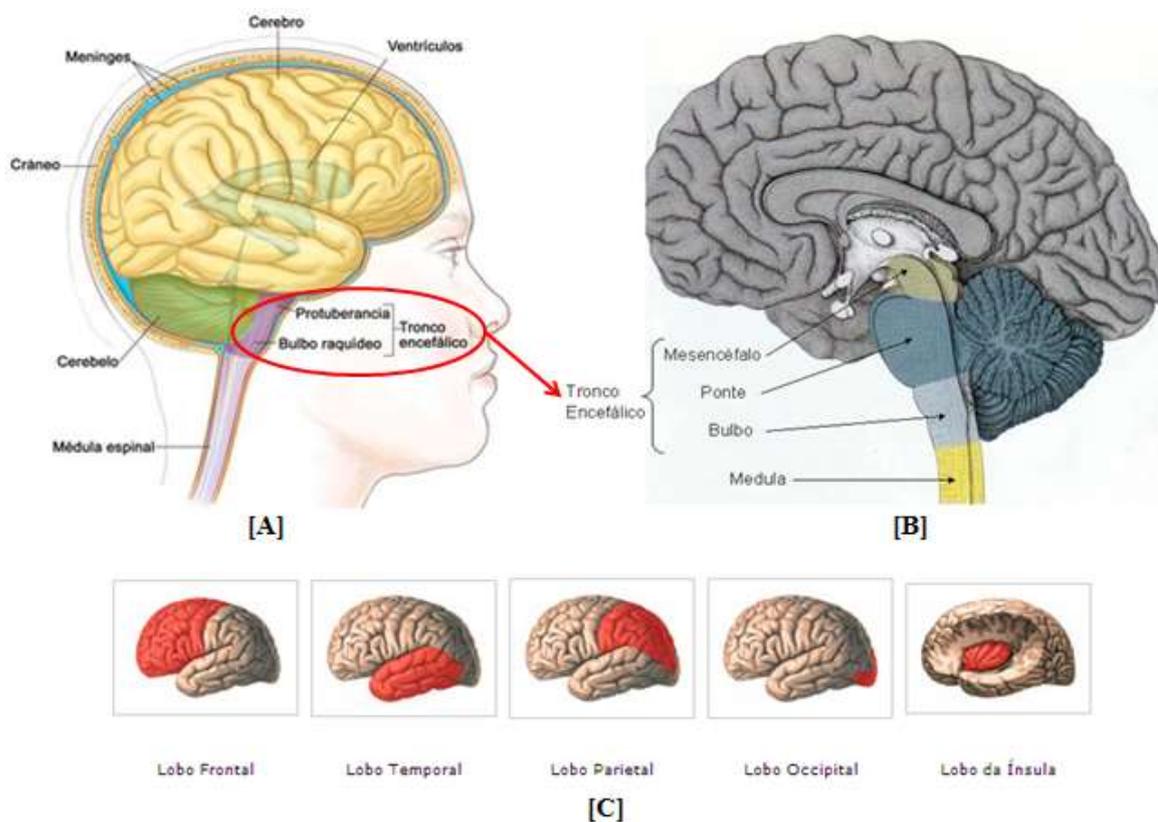


Figura 2 – Principais componentes do sistema nervoso central.

Fonte: Disponível em: www.cancer.gov; www.nerditos.com;

<http://cienciasnaturales.carpetapedagogica.com/2011/11/tronco-encefalico.html>

2 – TUMORES DO SNC

2.1 - Epidemiologia

No mundo, a incidência dos tumores primários do cérebro é de cerca de 7 indivíduos a cada 100.000 habitantes por ano variando de acordo com o sexo, sendo observada uma incidência mundial padronizada pela idade de aproximadamente 3,7 homens e 2,6 mulheres a cada 100.000 habitantes por ano, com taxas maiores em países desenvolvidos (5,8/100.000 homens e 4,1/100.000 mulheres) que em países menos desenvolvidos (3,0/100.000 homens e 2,1/100.000 mulheres) (BONDY et al., 2008; OSTROM et al., 2013). Apesar da baixa incidência mundial, esses tumores são o segundo grupo de neoplasias mais comuns em crianças, atrás apenas das leucemias/linfomas, sendo o mais frequente tumor sólido na faixa etária pediátrica, e são extremamente agressivos, apresentando alta morbidade e mortalidade, sendo a mortalidade, assim como a incidência, maior em países desenvolvidos que em desenvolvimento, devido a maior cobertura em saúde e tecnologia e maiores registros de câncer, com taxas de mortalidade variando de acordo com o tipo histológico do tumor. Esses

tumores representam um grupo bastante heterogêneo de neoplasias, e dentre eles, os tumores do SNC são os mais frequentes, representando 1,9% de todas as neoplasias malignas, ocupando décima quarta e décima quinta posição entre os homens e mulheres, respectivamente (OSTROM et al., 2013).

No Brasil, as taxas brutas de incidência dos tumores do SNC estimadas para 2014, com exceção dos tumores de pele não-melanoma, são de 5,07 em homens e 4,05 em mulheres a cada 100.000 habitantes. Nos homens, esses tumores constituem o décimo tumor mais incidente e nas mulheres o décimo primeiro (Figura 3), com uma estimativa de 4.960 casos novos em homens e 4.130 em mulheres. Na região Nordeste, nos homens, esses tumores sobem para a nona posição e caem para décima segunda nas mulheres, sendo estimados 1.070 e 770 casos novos em homens e mulheres, respectivamente (Figura 4). No Estado do Ceará, é estimado 350 casos novos e na capital Fortaleza 140 casos novos de tumores do SNC para 2014, subindo para a sétima posição na capital, provavelmente devido a ausência ou acesso tardio ao diagnóstico (INCA, 2014).



Figura 3- Taxas brutas de incidência das localizações primárias dos tumores do SNC estimadas para 2014, em homens e mulheres no Brasil.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2014.

Localização Primária	Casos Novos	%		Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	12.930	27,2%		Mama feminina	10.490	20,4%
Estômago	2.790	5,9%		Colo do útero	5.370	10,4%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.450	5,2%		Cólon e Reto	2.220	4,3%
Cavidade Oral	1.960	4,1%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	1.830	3,6%
Cólon e Reto	1.680	3,5%		Estômago	1.820	3,5%
Esôfago	1.230	2,6%		Glândula Tireoide	1.610	3,1%
Laringe	1.220	2,6%		Ovário	1.150	2,2%
Leucemias	1.110	2,3%		Corpo do útero	1.140	2,2%
Sistema Nervoso Central	1.070	2,3%		Cavidade Oral	1.060	2,1%
Linfoma não-Hodgkin	930	2,0%		Leucemias	970	1,9%
Bexiga	780	1,6%		Linfoma não-Hodgkin	790	1,5%
Pele Melanoma	440	0,9%		Sistema Nervoso Central	770	1,5%
Glândula Tireoide	360	0,8%		Esôfago	510	1,0%
Linfoma de Hodgkin	220	0,5%		Bexiga	340	0,7%
Todas as Neoplasias sem pele	36.530			Pele Melanoma	330	0,6%
Todas as Neoplasias	47.520		Laringe	280	0,5%	
			Linfoma de Hodgkin	140	0,3%	
			Todas as Neoplasias sem pele	38.230		
			Todas as Neoplasias	51.540		

Figura 4 - Estimativa do número de casos novos, segundo sexo, na Região Nordeste, em 2014.
Fonte: INCA, 2014.

2.2 – Fatores de risco

Estudos epidemiológicos envolvendo tumores do SNC têm examinado muitos fatores de risco associados ao desenvolvimento destes tumores, contudo, segundo *Brain Tumor Epidemiology Consortium (BTEC)*, a literatura epidemiológica dos tumores do cérebro ainda é inconclusiva (BONDY et al., 2008; OMURO; DeANGELIS, 2013). Existem alguns estudos com resultados promissores, incluindo aqueles com definição de alguns fatores de risco genéticos, como a associação de síndromes hereditárias raras, incluindo Cowden, Turcot, Li-Fraumeni, neurofibromatose tipo 1 e 2, esclerose tuberosa e schwannomatose familiar, com risco aumentado do desenvolvimento desses tumores. Inversamente, os gliomas são pouco associados com a presença de doenças atópicas tais como asma e eczema (LINOS et al., 2007; GU et al., 2009).

Dentre os fatores físicos, químicos e biológicos associados ao desenvolvimento e progressão destes tumores, a exposição a radiação ionizante é o fator de risco físico bem estabelecido para desenvolvimento de tumores do SNC (BONDY et al., 2008). Já a exposição a aparelhos celulares e outros tipos de campos eletromagnéticos, alimentos contendo compostos n-nitrosos e aspartame, traumatismo craniano, tabagismo, drogas, pesticidas e metais pesados carecem de consistência epidemiológica e comprovação multicêntrica (BONDY et al., 2008; CORLE et al., 2012). Adicionalmente, apesar de alguns estudos encontrarem associação entre alguns vírus, tais como o citomegalovírus humano (CMV) e gliomas, outros não observam essa associação com este fator biológico (COBBS et al., 2002; LAU et al., 2005; SABATIER et al.,

2005; POLTERMANN et al., 2006; DZIURZYNSKI et al., 2012), mostrando o seu caráter controverso. Medidas preventivas, tais como mudanças no estilo de vida, são ineficazes para evitar esses tumores (OMURO; DeANGELIS, 2013).

2.3 – Classificação histopatológica dos tumores do SNC e graduação

Uma variedade de esquemas para classificação e graduação dos tumores do SNC foi realizada, incluindo aqueles de Zulch, Ringertz, Burger, St. Anne-Mayo, Kleihues, Bailey e Cushing (BAILEY; CUSHING, 1926; ZULCH, 1979; KLEIHUES; CAVENEE, 2000; DAUMAS-DUPORT; VARLET, 2003). Atualmente, a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), a mais difundidamente utilizada, reconhece mais de 120 tipos histológicos de tumores do SNC, e classificam-os de acordo com a tipificação celular de origem desses tumores, cujas entidades tumorais seriam definidas primariamente pela morfologia das células e pela sua disposição tecidual (Tabela 1) (LOUIS et al., 2007). Dentre estes, os meningiomas e os gliomas são os mais comuns (Figura 5). Os gliomas são um grupo heterogêneo de tumores primários neuroectodermiais que representam cerca de 80% dos tumores malignos do SNC (LOUIS et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2010; OSTROM et al., 2013). Estes tumores se originam de células gliais, como os astrócitos, oligodendrócitos, microglia e ependimócitos (Figura 6), sendo os astrocitomas, gliomas derivados dos astrócitos, os mais frequentes (OSTROM et al., 2013). Os astrócitos são células responsáveis pelo suporte tecidual, nutrição, equilíbrio iônico, metabolismo dos neurotransmissores e defesa imunológica dos neurônios e comunicam-se entre si através de sinais químicos, formando uma rede independente e paralela à neuronal, auxiliando a formação de sinapses (MACHADO, 2000).

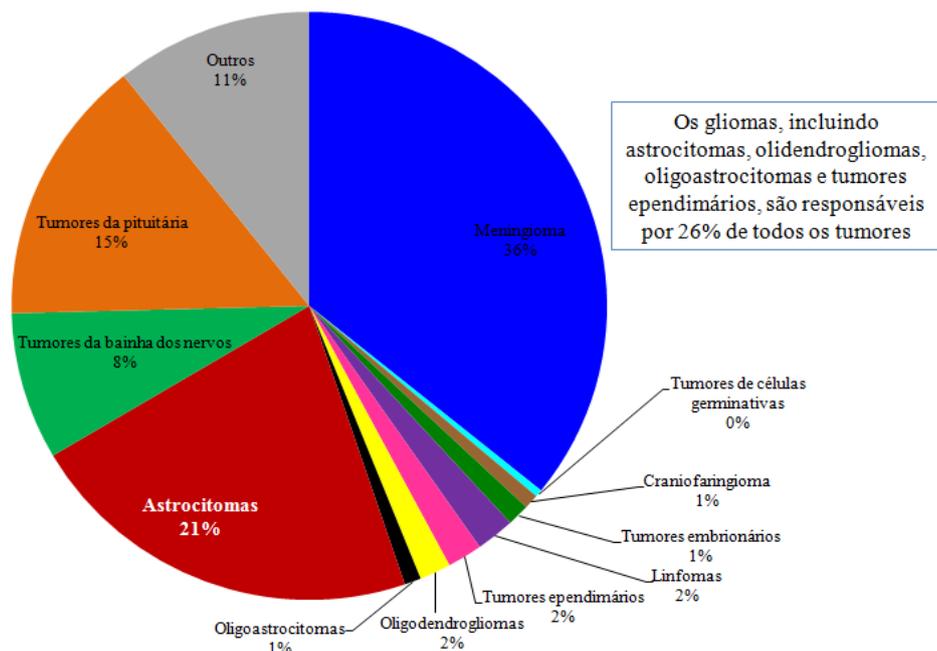


Figura 5 – Frequência dos principais tumores do SNC.
Fonte: Adaptado de OSTROM et al., 2013.

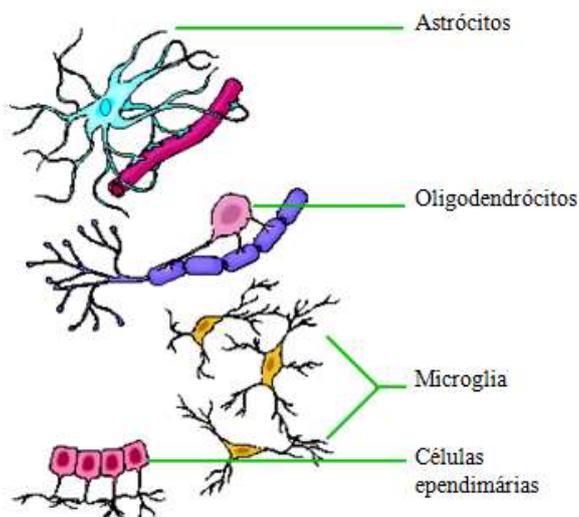


Figura 6 – Células da glia do SNC.
Fonte: Disponível em <http://neuralsystem.blogspot.com.br/2008/11/clulas-gliais-ou-clulas-da-glia.html>

Adicionalmente, esses tumores são divididos em níveis crescentes de malignidade que variam de I a IV (Tabela 01), sendo o último mais agressivo e com pior prognóstico. Os critérios de malignidade são definidos pela presença de indicadores como neovascularização, mitose, atipia nuclear e necrose. A graduação tumoral é determinada pelo número de critérios, sendo que os tumores de grau I não apresentam 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 mitose; e o grau IV apresenta 2 ou 3 critérios, atipia nuclear, mitose, proliferação endotelial e/ou necrose (LOUIS et al., 2007).

Tabela 01 – A classificação parcial dos tumores do SNC de origem neuroepitelial, segundo a OMS.

TUMORES DO SNC DO TECIDO NEUROEPITELIAL			
	Código ICD-O e SNOMED¹	Comportamento biológico²	Gradação
Tumores astrocíticos			
Astrocitoma pilocítico	9421	1	GRAU I
Astrocitoma pilomixóide	9425	3	GRAU II
Astrocitoma de células gigantes subependimárias	9384	1	GRAU I
Xantastrocitoma pleomórfico	9424	3	GRAU II
Astrocitoma difuso	9400	3	GRAU II
Astrocitoma fibrilar	9420	3	GRAU II
Astrocitoma gemistocítico	9411	3	GRAU II
Astrocitoma protoplasmático	9410	3	GRAU II
Astrocitoma anaplásico	9401	3	GRAU III
Glioblastoma	9440	3	GRAU IV
Glioblastoma de células gigantes	9441	3	GRAU IV
Gliosarcoma	9442	3	GRAU IV
Gliomatose cerebral	9381	3	GRAU IV
Tumores oligodendrogliais			
Oligodendroglioma	9450	3	GRAU II
Oligodendroglioma anaplásico	9451	3	GRAU III
Tumores oligoastrocíticos			
Oligoastrocitoma	9382	3	GRAU II
Oligoastrocitoma anaplásico	9382	3	GRAU III
Tumores ependimários			
Subependimoma	9383	1	GRAU I
Ependimoma mixopapilar	9394	1	GRAU I
Ependimoma	9391	3	GRAU II
Celular	9391	3	GRAU II
Papilífero	9393	3	GRAU II
Células claras	9391	3	GRAU II
Taniciticos	9391	3	GRAU II
Ependimoma anaplásico	9392	3	GRAU III
Tumores do plexo coróide			
Papiloma do plexo coróide	9390	0	GRAU I
Papiloma do plexo coróide atípico	9390	1	GRAU II
Carcinoma do plexo coróide	9390	3	GRAU III
Outros tumores neuroepiteliais			
Astroblastoma	9430	3	GRAU IV
Glioma cordóide do terceiro ventrículo	9444	1	GRAU II
Glioma angiocêntrico	9431	1	GRAU I
Tumores neuronais e neuronal-gliais mistos			
Gangliocitoma displástico do cerebelo	9493	0	GRAU I
Astrocitoma/ganglioglioma infantil desmoplástico	9412	1	GRAU I
Tumor neuroepitelial disembríoplastico	9413	0	GRAU I
Gangliocitoma	9492	0	GRAU I
Ganglioglioma	9505	1	GRAU I
Ganglioglioma anaplástico	9505	3	GRAU III
Neurocitoma central	9506	1	GRAU II
Neurocitoma extraventricular	9506	1	GRAU II
Liponeurocitoma cerebelar	9506	1	GRAU II
Tumor glioneuronal papilífero	9509	1	GRAU I
Tumor glioneuronal formando-roseta do quarto ventrículo	9509	1	GRAU I
Paraganglioma	8680	1	GRAU I
Tumores da região pineal			
Pineocitoma	9361	1	GRAU I
Tumor parenquimal pineal de diferenciação intermediária	9362	3	GRAU II/ III
Pineoblastoma	9362	3	GRAU IV
Tumor papilífero da região pineal	9395	3	GRAU II/ III

Tumores embrionários			
Meduloblastoma	9470	3	GRAU IV
Meduloblastoma nodular/desmoplástico	9471	3	GRAU IV
Meduloblastoma com nodularidade extensiva	9471	3	GRAU IV
Meduloblastoma anaplástico	9474	3	GRAU IV
Meduloblastoma de células grandes	9474	3	GRAU IV
Tumor neuroectodermal primitivo do SNC	9473	3	GRAU IV
Neuroblastoma SNC	9500	3	GRAU IV
Ganglioneuroblastoma SNC	9490	3	GRAU IV
Meduloepitelioma	9501	3	GRAU IV
Ependimoblastoma	9392	3	GRAU IV
Tumor rabdoide/teratóide atípico	9508	3	GRAU IV

¹ Código da Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (ICD-O) e da Nomenclatura Sistematizada em Medicina (SNOMED). ² O comportamento biológico é qualificado em (0) benigno, (1) malignidade baixa, limítrofe ou incerta, (2) lesões in situ e (3) maligno. Adaptado de Louis et al., 2007.

3 - ASTROCITOMAS

O termo astrocitoma foi inicialmente usado no final do século XIX por Virchow, em 1863, para designar tumores compostos predominantemente por astrócitos atípicos, que se caracterizam por núcleos aumentados, alongados ou hipercromáticos com citoplasmas escassos e pouco definidos. Contudo, esse termo foi somente empregado, definitivamente, na classificação histopatológica proposta por Bailey e Cushing, em 1926, baseado nos padrões celulares de diferenciação destes tumores. Esta classificação foi aprimorada décadas mais tarde pelo uso de fatores histopatológicos, como grau e prognóstico (LOUIS et al., 2007).

3.1 - Caracterização dos astrocitomas

Os astrocitomas apresentam características histopatológicas, epidemiológicas e alterações genéticas que os distinguem entre os seus diferentes graus (LOUIS et al., 2007; GLADSON; PRAYSON; LIU, 2010). Entre as alterações genéticas, existem aquelas que são características e bem estabelecidas de um grau tumoral específico, sendo consideradas assinaturas genéticas desses tumores (FURNARI et al., 2007; LOUIS et al., 2007; WEN; KESARI, 2008; GLADSON; PRAYSON; LIU, 2010). A seguir, serão descritas as características histopatológicas, epidemiológicas e genéticas mais relevantes dos astrocitomas.

a) Astrocitomas de grau I

Os astrocitomas de grau I incluem os astrocitomas pilocíticos e de células gigantes subependimárias e são os astrocitomas mais frequentes em crianças e adolescentes, com o pico de incidência entre 8 a 13 anos, sem uma predileção ao sexo específico. Ao contrário dos demais astrocitomas, o astrocitoma pilocítico caracteriza-se por um tumor normalmente cístico, circunscrito, de crescimento lento, que não progride para graus histológicos maiores, o que mostra seu caráter benigno. Esse tumor é localizado preferencialmente no cerebelo, apesar de

ser observado em outras regiões, tais como o nervo óptico, quiasma óptico, hipotálamo, tálamo, gânglios da base e tronco cerebral. Histologicamente, esse tumor de baixa a moderada celularidade, apresenta um padrão bifásico com proporções variando de células bipolares compactadas associadas com fibras de Rosenthal e células soltas de estruturas multipolares com microcistos e corpos granulares (LOUIS et al., 2007; MARKO; WEIL, 2012).

As alterações genéticas dos tumores do grau I são distintas das alterações observadas nos demais graus, reforçando o fato desses tumores não progredirem para fenótipos mais malignos. Estudos citogenéticos demonstram que a maioria desses tumores apresenta um cariótipo normal, contudo é observada uma variação cariotípica aberrante em alguns tumores tais como, ganho dos cromossomos 7, 8 e 22, deleção ou ganho do cromossomo 19 e perdas no cromossomo 17q, incluindo a região codificadora do gene *NFI*, que codifica a proteína neurofibromina, com funções supressoras tumorais. A desregulação desse gene parece assumir um papel relevante para origem do astrocitoma pilocítico (FURNARI et al., 2007; GLADSON; PRAYSON; LIU, 2010).

b) Astrocitomas difusos (grau II a IV)

Os astrocitomas difusamente infiltrativos, de grau II-IV, são mais comuns em adultos que em crianças e incluem o xantastrocitoma pleomórfico, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e glioblastoma (LOUIS et al., 2007). Ao contrário do astrocitoma pilocítico, esse grupo de tumores é caracterizado pela sua alta capacidade para invasão, com infiltração difusa do tecido encefálico normal e um significativo potencial para progressão tumoral (WEN; KESARI et al., 2008; OMURO; DEANGELIS, 2013). Os astrocitomas de grau II e III podem progredir para o grau IV, processo este de extrema 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 (LOUIS et al., 2007).

Astrocitoma Grau II

Os astrocitomas do grau II, também chamado de astrocitoma de baixo grau ou simplesmente astrocitoma difuso, incluem os astrocitomas gemistocíticos, fibrilares e protoplasmáticos e são tumores bem diferenciados, que tipicamente afetam adultos jovens, entre 30 a 40 anos de idade, e preferencialmente acometem homens (LOUIS et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2010). É caracterizado por alto grau de diferenciação celular e crescimento

lento. O tumor pode acometer todo o SNC, mas é preferencialmente localizado nos hemisférios cerebrais e tem uma tendência intrínseca para progressão malignante a astrocitoma anaplásico e, ultimamente, glioblastoma (LOUIS et al., 2007). Histologicamente, esses tumores são bem diferenciados, de celularidade de baixa a moderada quando comparada ao cérebro normal, com infiltração difusa generalizada do parênquima adjacente, sendo a degeneração microcística um achado comum e a atipia nuclear uma característica típica. A atividade mitótica é baixa e a necrose e proliferação microvascular são ausentes. As três variantes desses tumores (astrocitoma fibrilar, gemistocítico e protoplasmático) apresentam características peculiares. O astrocitoma fibrilar é a variante mais comum e é composta de astrócitos neoplásicos multipolares com citoplasma escasso. A variante gemistocítica é caracterizada pela presença dos chamados astrócitos gemistocíticos, que tem um grande citoplasma eosinofílico e núcleo excêntrico; já o astrocitoma protoplasmático são variantes raras e são compostas de astrócitos neoplásicos com citoplasma eosinofílico pequeno e pouco processos flácidas embebidas numa matriz microcístico ou mucóide (LOUIS et al., 2007; GLADSON; PRAYSON; LIU, 2010).

As alterações genéticas relacionadas a formação do astrocitoma de grau II incluem a inativação do gene supressor tumoral *p53*, trissomia/polissomia do cromossomo 7, perda do cromossomo 22q, 13q, 10p, 6 e cromossomos sexuais e ativação do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF – *Platelet Derived Growth Factor*) e ou do seu receptor (REIFENBERGER; COLLINS, 2004; FURNARI et al., 2007; GLADSON; PRAYSON; LIU, 2010).

Astrocitoma grau III (anaplásico)

Os astrocitomas anaplásicos, similarmente aos astrocitomas de grau II, são preferencialmente localizados nos hemisférios cerebrais contudo, acometem adultos em uma faixa etária ligeiramente mais alta. Esses tumores podem vir do astrocitoma difuso de grau II ou *de novo*, ou seja, sem evidência de lesão precursora de grau de malignidade menor e tem uma tendência a sofrer progressão ao glioblastoma. Histologicamente é caracterizado por atipia nuclear, celularidade aumentada e atividade mitótica acentuada, sem a presença de proliferação microvascular e necrose (REIFENBERGER; COLLINS, 2004; LOUIS et al., 2007).

Geneticamente, assim como no astrocitoma de grau II, frequências similares de mutações do gene *p53* e ganho do cromossomo 7 são encontradas nos astrocitomas anaplásicos. Adicionalmente, em 30% dos astrocitomas anaplásicos é observada a deleção do cromossomo 13q13, que leva a perda do gene que codifica a proteína Rb, um regulador da progressão do

ciclo celular, sendo também observada com maior frequência a deleção do cromossomo 19p. Outra alteração importante, que acomete aproximadamente 50% destes tumores, é a inativação do gene *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*). Esse gene é localizado no braço curto do cromossomo 9 humano e é o protótipo de uma família de inibidores de quinases dependentes de ciclina 4 do ciclo celular (*INK4 – inhibitors of Cdk4*). Ele se encontra no *locus INK4a/ARF/INK4b*, um fragmento pequeno de 35 kb do genoma humano, que contém também mais dois genes, o *ARF*, também conhecido de *p19^{ARF}* e *p14^{ARF}*, e o *p15^{INK4b}*, todos codificam proteínas supressoras tumorais (KIM; SHARPLESS, 2006). A partir da figura 7 é possível observar que o gene *CDKN2A* possui três exons, dos quais dois são compartilhados com *ARF*.

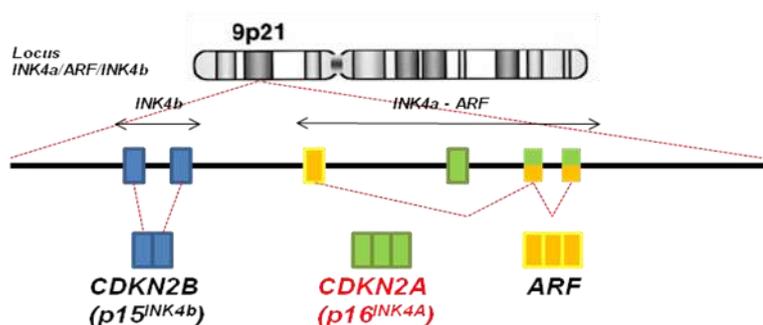


Figura 7 – Representação esquemática do locus *INK4a/ARF/INK4b*.

Fonte: Adaptado de Kim; Sharpless, 2006.

O gene *CDKN2A*, codifica a proteína *p16^{INK4A}*, que atua na fase G1 (*Gap 1*) do ciclo celular, inibindo a progressão para fase seguinte do ciclo, através da inibição seletiva da formação dos complexos ciclina D/quinase dependente de ciclina 4 ou 6 (CDK4 ou CDK6). Como consequência, a proteína retinoblastoma (*pRB*) não é fosforilada e retém os fatores de transcrição da família E2F, uma vez que a sua fosforilação promove a liberação desses fatores. As proteínas E2F ativam a transcrição de vários genes cujos produtos são essenciais para a progressão das células através da fase S (ALBERTS et al., 2010) (Figura 8).

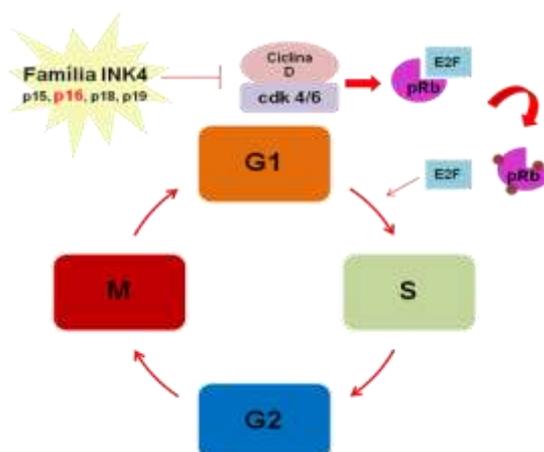


Figura 8 – Ponto de atuação da proteína *p16* no ciclo celular. G1 – Fase Gap1; S – Síntese; G2 – Fase Gap2; M – Mitose; CDK – Quinases dependente de ciclina; *pRb* – proteína retinoblastoma; E2F – Fator E2.

O principal mecanismo de inativação de *CDKN2A* é a hipermetilação de região promotora, apesar de ser relacionado, em menor frequência, a deleção desse gene (FUEYO et al., 1996; HEGI et al., 1997; WATANABE et al., 2001; WAKABAYASHI et al., 2009). A metilação do DNA consiste em uma modificação química na estrutura do DNA catalisada por uma família de enzimas denominadas de DNA metiltransferases (DNMTs). Nesta reação, um grupo metil (-CH₃) é covalentemente adicionado ao carbono 5 da citosina em dinucleotídeos CpG (Citosinas próximas a Guaninas), em regiões do DNA de 0,5 a 2 kb de comprimento, ricas em conteúdo CpG, conhecidas como ilhas CpG. Estas regiões são presentes principalmente em regiões promotoras de aproximadamente 40-50% de genes (LAIRD, 2003). O grupo metil utilizado nessa reação é transferido da S-adenosilmetionina (SAM) pela família de enzima DNA Metil-Transferase (DNMT) convertendo-a em S-adenosilhomocisteína (SAH) ao final da reação (WAJED et al., 2001) (Figura 9).

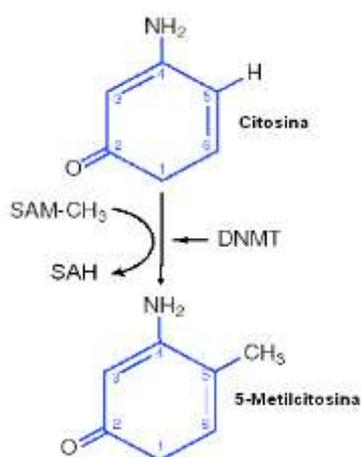


Figura 9- Representação esquemática da conversão da citosina em 5-metilcitosina catalisada pela DNA Metil-Transferase (DNMT). SAM – S-adenosilmetionina; SAH – S-adenosilhomocisteína; DNMT – DNA metiltransferase.
Fonte: Adaptado de Wajed et al., 2001

A metilação do DNA em região promotora em ilhas CpG pode bloquear a transcrição do gene *CDKN2A* por interferir diretamente com a ligação de fatores de transcrição aos seus sítios alvos de ligação. Outro mecanismo proposto e atualmente mais aceito é que a metilação do DNA leva a ligação de uma família de proteínas denominadas de proteínas com domínio de ligação ao metil (MBD- *Methyl-Binding Domain*), permitindo a ligação especificamente ao DNA contendo sítios CpG metilados. Essa família contém cinco membros dos quais três são conhecidos, MeCP2, MBD2 e MBD3, e possuem a capacidade de associa-se com complexos de proteínas grandes, tais como o complexo NuRD e Sin3a (STRATHDEE; BROWN, 2002), contendo desacetilases de histonas (HDAC1 e HDAC2) e remodeladores de cromatina (Sin3a e

mi-2), que resultam na produção de uma cromatina mais compacta, refratária a transcrição (TYLER; KADONAGA, 1999) (Figura 10).

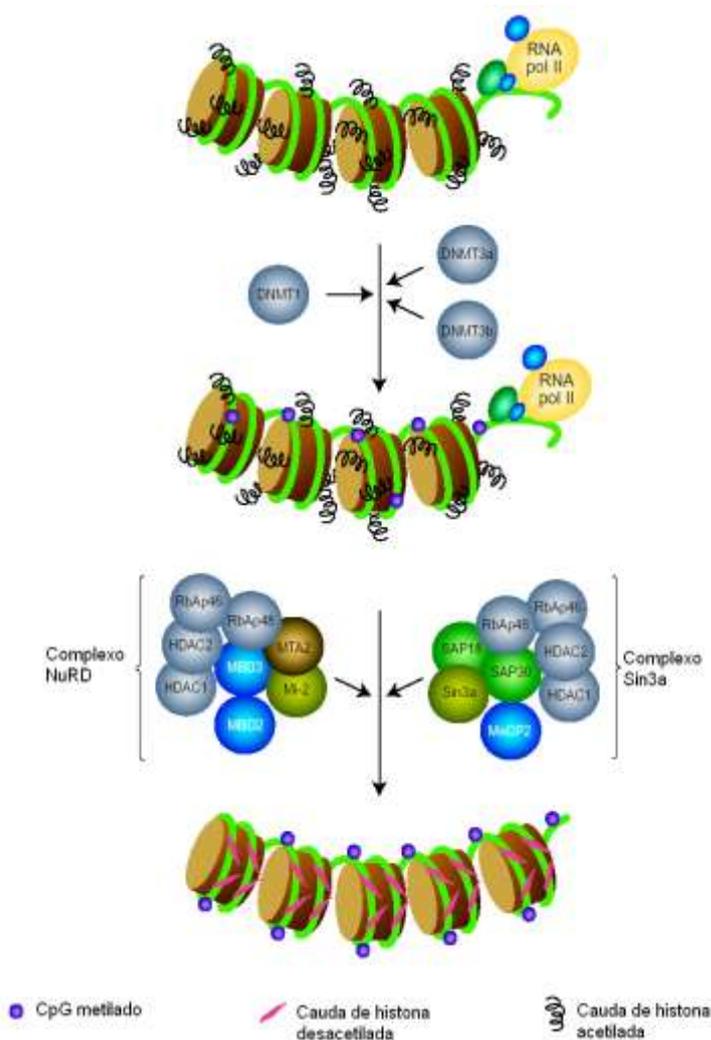


Figura 10 – Mecanismo de repressão transcricional mediado por metilação do DNA.
Fonte: Adaptado de Strathdee; Brown, 2002.

Astrocitoma grau IV (Glioblastoma)

É o tumor primário do cérebro mais frequente, mais agressivo e mais maligno, e incluem as duas variantes histológicas desses tumores, os glioblastomas de células gigantes e gliossarcoma (REIFENBERGER; COLLINS, 2004; LOUIS et al., 2007). Os astrocitomas de grau IV tipicamente afetam adultos, com um pico de incidência entre 45-75 anos de idade e são preferencialmente localizados nos hemisférios cerebrais, particularmente nas regiões fronto-temporal e parietal. Devido a sua natureza invasiva, glioblastomas não podem ser completamente ressectados e apesar dos progressos na terapia, menos da metade dos pacientes sobrevivem mais que um ano, sendo a idade mais avançada e a ressecção subtotal os fatores prognósticos adversos mais significativos. Contudo, apesar do rápido crescimento e do grande

potencial infiltrativo, raramente invadem o espaço subaracnóideo e, assim, dificilmente produzem metástases (LOUIS et al., 2007).

Histologicamente, o glioblastoma caracteriza-se por atipia nuclear, pleomorfismo, atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose (REIFENBERGER; COLLINS, 2004; LOUIS et al., 2007). O pleomorfismo celular manifesta-se através de células bipolares, fusiformes, fasciculadas e pequenas (indiferenciadas ou gigantes, contendo inclusões lipídicas e granulações citoplasmáticas), apresentando núcleos aberrantes, por vezes múltiplos. Esse pleomorfismo varia de acordo com as variantes do astrocitoma de grau IV. A variante do glioblastoma de células gigantes se caracteriza pelo predomínio de células gigantes multinucleadas bizarras assentadas sobre estroma rico em reticulina; já no gliossarcoma é observada áreas tumorais variando entre o aspecto gliomatoso e o mesenquimal, manifestando diferenciação condróide, osteóide, rabdóide, entre outras. Em adição ao pleomorfismo celular, a proliferação microvascular, que aparece como tufos de aspecto glomerulóide rodeando as áreas necróticas, e a necrose, secundária ao insuficiente suprimento sanguíneo tumoral, que ocorre de duas formas distintas: em áreas necróticas, com focos hemorrágicos dispersos, ou em pequenas clareiras irregulares, múltiplas, rodeadas por pequenas células tumorais fusiformes, chamada de necrose geográfica ou pseudopaliçada, são as marcas histológicas típicas dos tumores do grau IV (REIFENBERGER; COLLINS, 2004).

A maioria dos glioblastomas origina-se *de novo*, ou seja, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica da existência de uma lesão menos maligna anterior, sendo chamados de glioblastomas primários; ou pode desenvolver-se pela progressão de astrocitomas menos malignos (Grau II e III), sendo denominados de glioblastomas secundários (GLADSON; PRAYSON; LIU, 2010; FURNARI et al., 2010). Independente de sua origem, morfológicamente, os glioblastomas primários e secundários não podem ser distinguidos, sendo utilizado da avaliação de aspectos clínicos e genéticos para a sua diferenciação. O glioblastoma primário é mais frequente em pessoas mais velhas (idade média de 55 anos) e tem um prognóstico pior por apresentar lesões altamente infiltrativas, sendo deste modo mais resistente à terapia. Geneticamente, a amplificação do fator de crescimento epidérmico (EGFR), inativação de *CDKN2A* e *p14^{ARF}*, mutação do *PTEN*, simultaneamente à perda do cromossomo 10 e ganho do cromossomo 7 representam uma assinatura genética desses tumores, sendo a mutação do *p53* encontrada em menor frequência (aproximadamente 30%) (Figura 11). Diferentemente, os glioblastomas secundários se desenvolvem tipicamente em pacientes mais jovens e a via de inativação do *p53* assume papel relevante na formação destes tumores, sendo observada em torno de 60% dos casos, sendo a amplificação do *EGFR*

um evento mais raro (REIFENBERGER; COLLINS, 2004; GLADSON; PRAYSON; LIU, 2010; FURNARI et al., 2010).

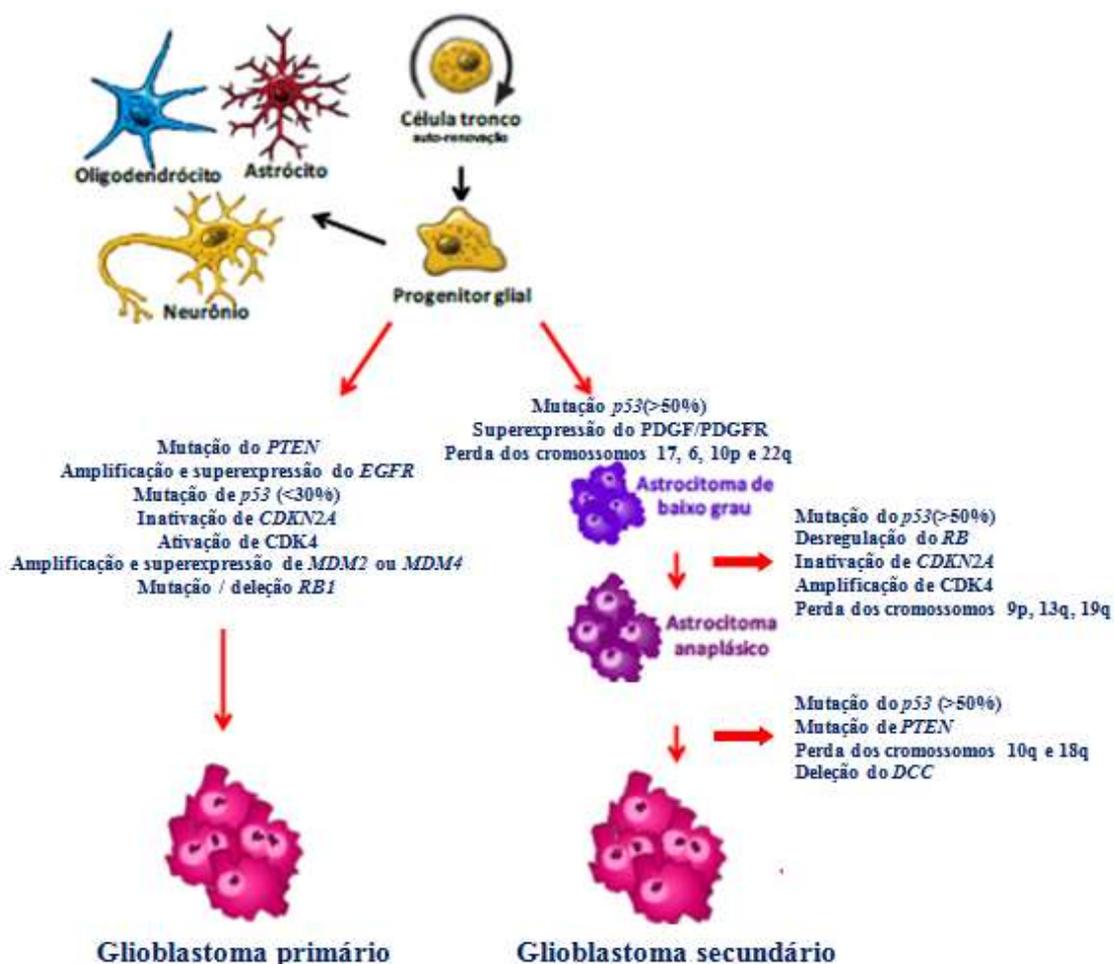


Figura 11 – Principais alterações genéticas envolvidas na progressão dos astrocitomas.

Fonte: Adaptado de Reifengerger; Collins, 2004.

PDGF – Platelet derived growth factor; *PTEN* – Phosphatase and tensin homology; *DCC* – Deleted in colon cancer; *EGFR* – Epidermal growth factor receptor; *MDM2* / 4 – Murine double minute clone 2 / 4.

3.2 - Diagnóstico

3.2.1- Sinais e sintomas

As manifestações clínicas dos astrocitomas dependem principalmente da localização do tumor do que de outros fatores, tais como, tipo histológico e idade (SCHNEIDER et al., 2010). Esses tumores podem causar praticamente qualquer tipo de distúrbio neurológico, que podem ser locais, tais como, fraqueza, perda somatossensorial, redução da acuidade visual, afasia ou globais, como cefaléia, náuseas, vômitos, papiledema, ou alteração do nível de consciência. Crises convulsivas, que podem ser focal ou generalizada, são comuns e é uma manifestação típica de astrocitomas de baixo grau. O agravamento rápido das manifestações

clínicas pode indicar crescimento maligno ou fluxo prejudicado de líquido cefalorraquidiano. As manifestações clínicas agudas, que são um sinal de herniação cerebral com risco de vida, ocorrem devido à hipertensão intracraniana e incluem cefaléia, vômitos e deterioração da consciência, levando ao coma. Ambos, tumores de crescimento lento e tumores de rápido crescimento, podem vir a causar herniação cerebral fatal. Os gliomas, mesmo os de alta malignidade, quase nunca causam metástase (WEN; KESARI, 2008; SCHNEIDER et al., 2010; OMURO; DeANGELIS, 2013).

O escore de *performance* de Karnofsky, que reflete o estado funcional geral de pacientes com tumores ou outras doenças, deve ser determinado em cada visita de acompanhamento clínico. Um escore baixo de Karnofsky e idade avançada prediz um prognóstico pobre e tem de ser levado em consideração no planejamento de medidas de diagnóstico e tratamento (STUPP; ROILA, 2009; SCHNEIDER et al., 2010; OMURO; DeANGELIS, 2013).

3.2.2- Técnicas neuroradiológicas gerais

O diagnóstico diferencial de um adulto apresentando sinais e sintomas que sugerem um tumor cerebral inclui ambas as condições neoplásicas e não-neoplásicas. A imagem neuroradiológica é a modalidade diagnóstica principal na avaliação de tumores cerebrais (WEN; KESARI, 2008; SCHNEIDER et al., 2010). Esses estudos de imagem são críticos para o planejamento pré-operatório e eles frequentemente dão informações sobre a etiologia de uma lesão em massa. Embora a neuroimagem não possa definitivamente estabelecer o tipo histológico específico do tumor do cérebro, a aparência característica na imagem frequentemente pode sugerir um diagnóstico. A ressonância magnética (RM) aumentada por gadolínio é usualmente o melhor teste para diagnosticar um tumor cerebral e ela pode prover também informações que indicam o tipo de tumor específico. Além de permitir a visualização do tumor e sua relação com o parênquima normal circundante, a RM também é superior à tomografia computadorizada (TC) para avaliação das meninges, espaço subaracnóide e da fossa posterior (SCHNEIDER et al., 2010).

3.2.3 –Exames laboratoriais

No laboratório, o exame do líquido cefalorraquidiano pode ajudar no diagnóstico diferencial de glioma de linfoma, abscesso cerebral ou um tumor de células germinativas.

Também é útil na avaliação da possível disseminação meníngea difusa de células tumorais (OMURO; DeANGELIS, 2013).

Apesar da busca constante por marcadores tumorais sorológicos específicos úteis para detecção precoce de astrocitomas, ainda não está disponível nenhum marcador para diagnóstico definitivo destes tumores.

3.3 - Tratamento

A terapia padrão para astrocitomas varia de acordo com o escore *performance* de Karnofsky do paciente, déficit neurológico e grau tumoral. Para os astrocitomas de grau I (pilocíticos), a ressecção cirúrgica total do tumor é o tratamento de escolha. O prognóstico desses tumores é excelente, com sobrevida livre de recorrência de mais de 20 anos. Assim como para os astrocitomas pilocíticos, o tratamento de escolha para os astrocitomas de grau II bem circunscritos anatomicamente e acessíveis cirurgicamente é a ressecção cirúrgica do tumor, que deve ser máxima, com mínimo de sequelas neurológicas significativas. Se a ressecção não é tecnicamente viável, biópsia seguida de radioterapia e/ou quimioterapia é indicada. É recomendado que a radioterapia seja administrada no pós-operatório, se houver sintomas neurológicos persistentes devido ao tumor, e em casos com um prognóstico pobre, incluindo aqueles com doença residual substancial ou a idade > 40 anos. No entanto, para os pacientes com um grande tumor residual ou outros fatores prognósticos negativos significativos, a quimioterapia adjuvante é uma alternativa (SATHORNSUMETEE; RICH; REARDON, 2007; WEN; KESARI, 2008; OMURO; DeANGELIS, 2013).

Nos astrocitomas malignos recém-diagnosticados, incluindo o anaplásico (grau III) e o glioblastoma (grau IV), a ressecção cirúrgica máxima consistente com a preservação da função neurológica é o passo inicial no tratamento. Embora a ressecção total máxima seja preferível sempre que possível, a ressecção subtotal pode ser necessária, dependendo da localização e extensão do tumor. Tanto para pacientes com astrocitoma anaplásico como glioblastoma, é recomendada radioterapia pós-operatória com quimioterapia concomitante e adjuvante (SATHORNSUMETEE; RICH; REARDON, 2007; WICK; WELLER, 2009; OMURO; DeANGELIS, 2013). Adicionalmente, a pesquisa de deleção nos cromossomos 1p e 19q e o padrão de metilação no promotor do gene *MGMT* (*O6-metilguanina metiltransferase*), que codifica uma proteína de reparo do DNA de mesmo nome, são atualmente parâmetros usados para auxiliar as decisões terapêuticas desses tumores (AHMED et al., 2014). Estudos apontam que os pacientes com gliomas malignos, como os tumores

oligodendrogliais, com deleções nos cromossomos 1p e 19q, respondem melhor ao tratamento quimioterápico e têm um prognóstico consistentemente melhor (REIFENBERGER et al., 1994; HOANG-XUAN et al., 2004). Cairncross et al. (2013) reportaram que a presença de deleções de 1p foi um marcador preditivo, levando a uma sobrevida média mais prolongada, para o grupo de pacientes com oligoastrocitoma anaplásico, que estavam recebendo quimioterapia com agentes alquilantes associada a radioterapia específica. Além do mais, o silenciamento do gene *MGMT*, por metilação do seu promotor, impede o reparo de danos no DNA e portanto, aumenta a eficácia da quimioterapia com agentes alquilantes, como temozolomida, aumentando a sobrevida desses pacientes, auxiliando na estratificação desses tumores com base nestes parâmetros (HEGI et al., 2008).

4 - ORIGEM CELULAR DOS TUMORES ASTROCÍTICOS

A origem das células dos tumores do SNC, incluindo os astrocitomas, é desconhecida (SINGH et al., 2004; FAN; SALFORD; WIDEGREN, 2007; ALTANER, 2008; PRESTEGARDEN; ENGER, 2010; MODREK; BAYIN; PLACANTONAKIS, 2014). Ao nível histopatológico, estes tumores, especialmente os glioblastomas, consistem de uma mistura heterogênea de tipos celulares com algumas evidências de multilinhagem de diferenciação (SINGH et al., 2004; LOUIS et al., 2007; DIMOV et al., 2011). Adicionalmente, têm sido identificado células com características “*stem-like*” nestes tumores (VESCOVI; GALLI; REYNOLDS, 2006; ALTANER, 2008; MODREK; BAYIN; PLACANTONAKIS, 2014), contudo, não é claro se essas neoplasias se originaram de tipos celulares maduros que foram induzidas a desdiferenciar em resposta as alterações genéticas/epigenéticas ou; de células indiferenciadas, tais como célula-tronco neural ou células primitivas progenitoras da glia que podem ter sido alvo da transformação na gliomatogênese (Figura 12) (ROJAS; BERTHOLDO; CASTILLO, 2012; MODREK; BAYIN; PLACANTONAKIS, 2014).

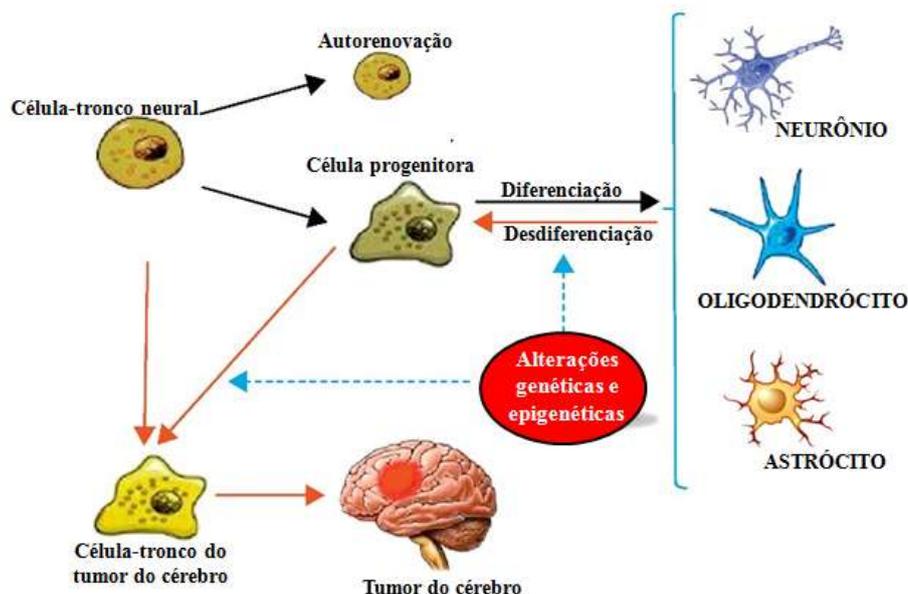


Figura 12 – Representação esquemática da possível origem celular do tumor do cérebro. Células-tronco neurais normalmente dão origem, através da divisão assimétrica, a uma célula progenitora neural (auto-renovação) e a uma célula progenitora que se diferencia em oligodendrócitos, neurônios e astrócitos. Alterações genéticas e epigenéticas em células-tronco neurais e as células progenitoras podem conduzir a transformação em célula-tronco do tumor no cérebro, bem como a desdiferenciação de células cerebrais diferenciadas.

Fonte: Adaptado de Rojas; Bertholdo; Castillo, 2012.

4.1 – Definição de células-tronco e progenitoras

As células-tronco podem ser definidas segundo três propriedades: auto-renovação, ou seja, capacidade de originar outra célula-tronco com características idênticas; habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular; e capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (CROWE; PARSA; SINHA, 2004; GÓMEZ-LÓPEZ; LERNER; PETRITSCH, 2014). Assim, as células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de diferenciação, podendo originar progenitores maduros, bem como células efectoras completamente diferenciadas. As células progenitoras se diferenciam das células-tronco pela sua auto-renovação e potencialidade limitadas. A potencialidade das células-tronco permite classificá-las em totipotente, pluripotente, multipotentes, oligopotentes e unipotentes. São chamadas de totipotentes as células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como zigoto e o blastômero; as pluripotentes podem originar todas as células que formam o embrião, sendo também chamadas de células-tronco embrionárias; as multipotentes originam apenas um subgrupo de linhagens celulares, por exemplo, as células-tronco mesenquimais e neurais, que são também chamadas de células-tronco adultas. Existem ainda as oligopotentes, capazes de gerar células mais restritas a uma linhagem do que as multipotentes, e as unipotentes, que originam apenas um único tipo

celular maduro, contudo, estas devem ser consideradas células progenitoras e não células-tronco (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

4.2 – Células-tronco e neurogênese

Há cerca de 50 anos atrás ainda se acreditava que o sistema nervoso adulto não seria capaz de se regenerar após um trauma ou lesão, ou seja, não havia a neurogênese nesse tecido. Na década de 1960, Altman mostrou que células, em divisão no encéfalo adulto poderiam originar novos neurônios, fato afirmado por Kaplan na década de 1970. Em 1980, a neurogênese foi observada pela primeira vez em pássaros e dez anos depois, células-tronco neurais multipotentes foram isoladas do encéfalo de roedores adultos e primatas (GOULD; TANAPAT, 1999) e, finalmente em humanos (ERIKSSON et al., 1998), ocorrendo em dois locais principais: na zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais e na zona subgranular do hipocampo (Figura 13) (ERIKSSON et al., 1998; CURTIS; LOW; FAULL, 2012). Na zona subventricular dos ventrículos laterais, as células endimárias são lateralmente recobertas por células-tronco neurais ou células-tronco tipo B, que originam-se da glia radial e esta última é derivada do neuroepitélio, durante a transição para a vida pós-natal. As células-tronco neurais tipo B, que ficam a maioria confinada na zona subventricular, são capazes de divisão assimétrica levando a produção de células gliais ou neurônios (Figura 14). Para produzir neurônios, as células tipo B dão origem as células de transição ou células tipo C, que proliferam e progridem para células tipo A, ou neuroblastos (Figura 14). Esses precursores neuronais migram para restabelecer interneurônios no bulbo olfatório, tornando-se neurônios granulares ou periglomerulares. Dependendo dos sinais regulatórios no nicho da zona subventricular, as células tipo B podem gerar astrócitos corticais ou células precursores oligodendrócitos (OPCs), que amadurecem para oligodendrócitos (Figura 14). Por outro lado, na formação do hipocampo, os astrócitos radiais (células tipo 1) servem como células-tronco, que diferenciam-se em células progenitoras intermediárias (células tipo 2), também chamadas de precursores astrocíticos tipo 2 (O2A), que formam células granulares imaturas (células tipo 3) e subsequentemente, amadureceram nos neurônios granulares encontrados no hipocampo (ALVAREZ-BUYLLA; GARCIA-VERDUGO, 2002; CURTIS; LOW; FAULL, 2012).

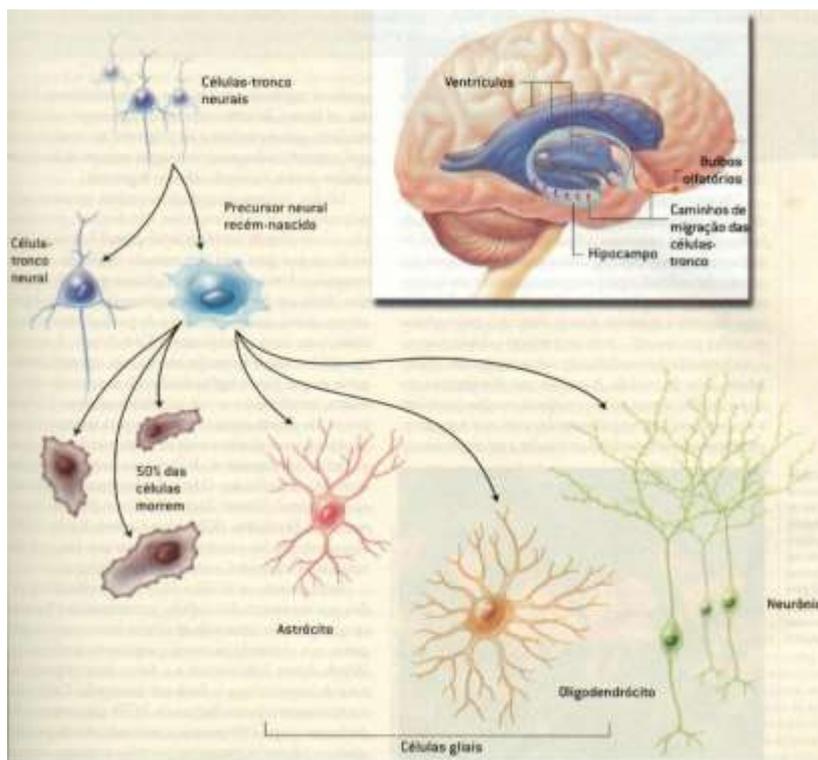


Figura 13 – Locais no SNC da neurogênese.

Fonte: Revista SCIENTIFIC AMERICAN - Brasil - ANO 2 Nº17 - Outubro de 2003. Disponível em: www.sciam.com.br

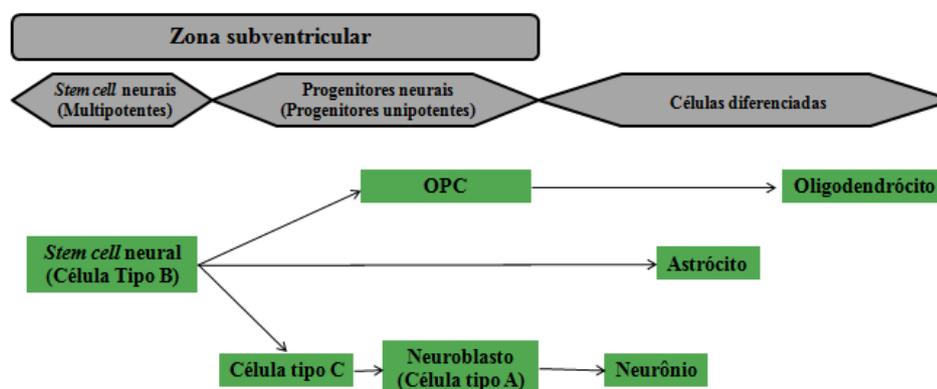


Figura 14 – Hierarquia celular neuroglial.

Fonte: Adaptado de Modrek; Bayin; Placantonakis, 2014.

4.3 - Células-tronco/Progenitoras e câncer

A primeira evidência do papel de células-tronco no câncer foi em 1994 em um estudo com pacientes com leucemia mielóide aguda. Anos depois, células-tronco do câncer humanas foram identificadas em tumores sólidos, incluindo câncer do cérebro (SINGH et al., 2004; FAN; SALFORD; WIDEGREN, 2007; PRESTEGARDEN; ENGER, 2010; MODREK; BAYIN; PLACANTONAKIS, 2014).

Em gliomas, a presença de células-tronco e progenitoras além de levantar questionamentos sobre a origem desses tumores, tem sido relacionada a progressão tumoral em malignidade, conduzindo aos fenótipos de baixa graduação a graus mais elevadas e a resistência a terapia (AHMED; AUFFINGER; LESNIAK, 2013; CARRASCO-GARCIA et al., 2013). Independente da origem celular desses tumores, a importância de definir as linhagens celulares vem das evidências de que a diferença de resposta à terapia mostra correlação com a linhagem celular, desde que as células mais indiferenciadas, como as células-tronco, são relacionadas a maior resistência a terapia (SINGH et al., 2004; ROJAS; BERTHOLDO; CASTILLO, 2012). Adicionalmente, essas células são distinguidas de outras células no tumor por alterações na expressão de seus genes, incluindo aqueles que codificam marcadores de superfície celular, como nestina, CD133, CD44, CXCR4, CD29 e CD24 ou fatores de transcrição, como OLIG2. Em ambas as possibilidades a expressão de antígenos relacionados à célula precursora se farão presentes e poderão ser usados como marcadores de linhagem celular (HE; LIU; LUBMAN, 2012; DAHLROT et al., 2013).

5 – MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS

5.1 – CD133

A proteína CD133 humana foi separada e isolada, em 1997, por Yin e colaboradores, a partir de células-tronco hematopoiéticas, usando o anticorpo monoclonal artificial AC133, sendo desde então usada como marcador de células-tronco em tecidos neoplásicos, incluindo em gliomas, onde é considerada uma célula-tronco neural (UCHIDA et al., 2000; CAMPOS; HEROLD-MENDE, 2011; GROSSE-GEHLING et al., 2013). A CD133 é também chamada de prominina, que vem da palavra em latim *prominere*, que significa proeminente ou saliente, característica observada em sua estrutura, por apresentar duas alças extracelulares grandes, além de uma região extracelular N-terminal, cinco domínios que atravessam a membrana, duas alças intracelulares pequenas ricas em cisteína e uma estrutura –COOH intracelular (Figura 15). Essa proteína é um membro da família de glicoproteínas transmembrânicas pentaméricas que contem 865 aminoácidos e peso molecular em torno de 120kDa. O gene que codifica essa proteína é localizado no cromossomo 4p15 e possui no mínimo 37 exons e tamanho em torno de 152kb (IROLLO; PIROZZI, 2013).

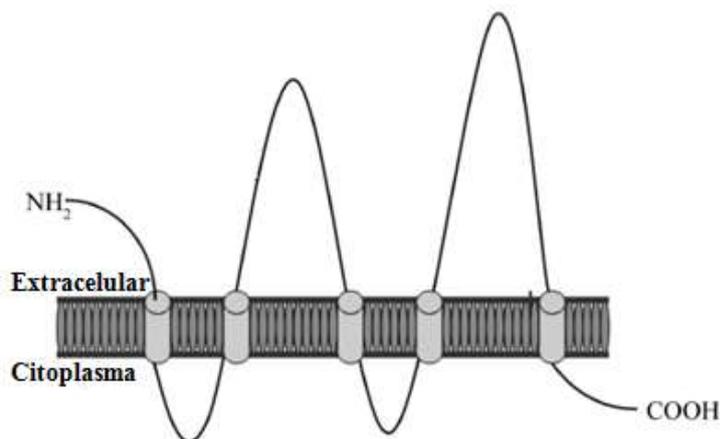


Figura 15 – Representação da proteína CD133.
Fonte: Adaptado de Zhang; Li, 2010.

CD133 é dividido em três tipos, CD133-1, CD133-2 e CD133-3. CD133-1 foi a primeira proteína a ser identificada e se diferencia das outras duas no seu processo de *splicing* do RNAm e na deleção em um exon pequeno (exon 4) que contém 27 nucleotídeos, levando a perda de 9 aminoácidos da região -NH₂ terminal. Essa proteína é encontrada no cérebro fetal e músculo esquelético de adultos, mas não foi detectada no fígado, rim fetal, pâncreas, rim e placenta de adultos. A CD133-3 foi a mais recentemente descoberta e foi encontrada no epidídimo. Diferente da CD133-1 e CD133-3, a proteína CD133-2 é o antígeno de superfície que foi reconhecido pelos anticorpos anti-CD133 no isolamento de células-tronco hematopoiéticas e é o antígeno atualmente usado na identificação de células-tronco em múltiplos tumores humanos (YU et al., 2011).

Até o momento, nem os ligantes nem as funções da CD133 são conhecidos (CORBEIL et al., 2001; ZHANG; LI, 2010; IROLLO; PIROZZI, 2013; GROSSE-GEHLING et al., 2013). Contudo, tem sido sugerido um papel potencial de CD133 na organização da membrana plasmática de células-tronco, incluindo células-tronco neurais. Consequentemente, muitos autores atribuem um papel funcional para CD133 como um "organizador" da topologia da membrana plasmática e também na manutenção da composição lipídica dessa membrana, sugerindo que CD133 poderia contribuir para auto-renovação de células-tronco particularmente através da organização da membrana plasmática (CORBEIL et al., 2001; MIZRAK et al., 2008). Segundo o modelo hipotético sugerido por Wei et al. (2013), o resíduo Y828 presente na alça citoplasmática da proteína CD133, quando fosforilado pela família de quinases Src, pode se ligar a subunidade p85 do regulador PI3K (*phosphoinositide 3-kinases*), resultando na ativação da via PI3K/Akt (*phosphoinositide 3-kinases/ protein kinase B*),

promovendo auto-renovação e formação de tumor de células-tronco de gliomas (Figura 16), sugerindo que CD133 é um marcador “funcional” de células iniciando o glioma.

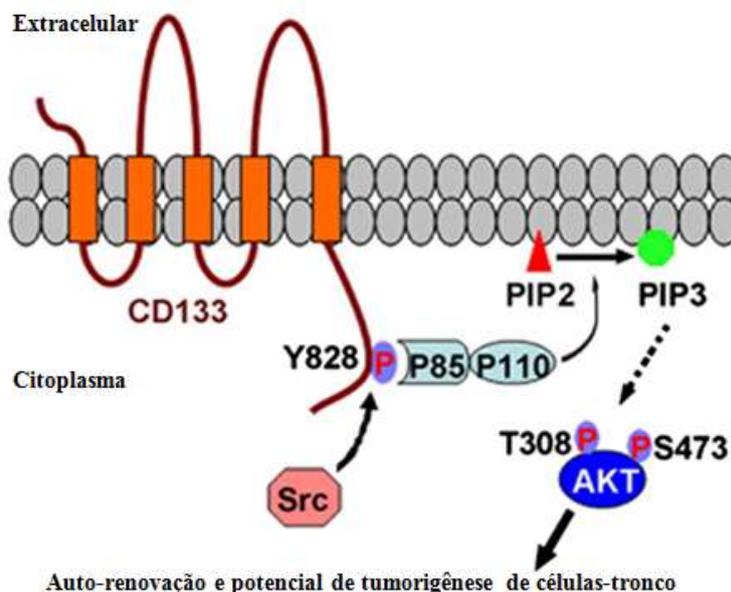


Figura 16 – Modelo hipotético da via de sinalização CD133/PI3K/Akt, regulando o comportamento de células-tronco em gliomas.

Fonte: Adaptado de Wei et al., 2013.

Adicionalmente, a proteína CD133 é relacionada com capacidade das células-tronco neurais e células progenitoras em evitar a divisão assimétrica e isto influencia potencialmente o balanço da proliferação *versus* diferenciação destas células (PINE et al., 2010). Portanto, CD133 além de ser sugerido como um marcador de divisão assimétrica de células-tronco no tumor, é também relacionada a plasticidade de linhagem e dormência das células tumorais (PINE et al., 2010; YU et al., 2011).

5.2 – CXCR4

No final de 1990, CXCR4, também chamado de CD184, foi descoberto em células T CD4⁺, como um correceptor de entrada para o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) (FENG et al., 1996) e recebeu esse nome por ser receptor de uma das quatro classes de quimiocinas (CXC, CX₃C, CC e C), pequenas proteínas de 8 a 12 kDa, a classe CXC (ALKHATIB, 2009; FURUSATO et al., 2010; TEICHER; FRICKER, 2010). Além de ser expresso nessas células, o CXCR4 é também encontrado em células-tronco pluripotentes embrionárias e em tipos variados de células-tronco comprometidas com um tecido específico (KUCIA et al., 2005; MILLER; BANISADR; BHATTACHARYYA, 2008). Esse receptor de quimiocina é acoplado a proteína G e o gene que o codifica é localizado no cromossomo 2. Ele tem uma estrutura transmembrânica com uma extremidade curta N-terminal extracelular,

sete domínios transmembranares helicoidais, três alças intracelulares e três extracelulares e uma região C terminal intracelular, contendo serina e treonina, que atuam como locais de fosforilação durante a ativação desse receptor via proteína G (TEICHER; FRICKER, 2010) (Figura 17).

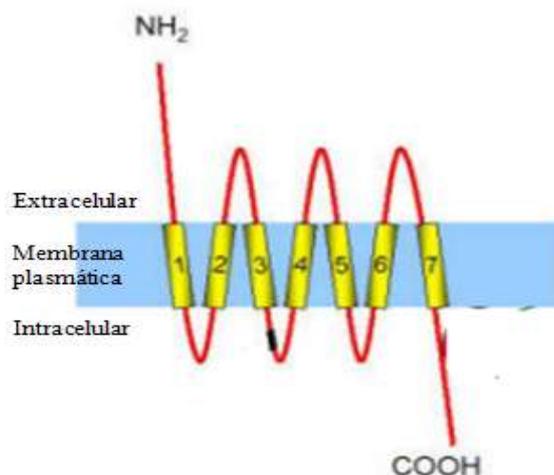


Figura 17 – Representação esquemática do receptor CXCR4.
Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/16/11/2927/F1.large.jpg>

Os efeitos biológicos do CXCR4 são exercidos através da sua ligação ao seu ligante, o CXCL12, iniciando vias de sinalização divergentes (Figura 18). CXCR4-CXCL12 leva a formação de um complexo juntamente com a subunidade $G\alpha_1$ da proteína G, resultando na inibição da produção de monofosfato de adenosina ciclíca mediada por adenilil ciclase e mobilização de cálcio intracelular. A dissociação da subunidade $G\alpha_i$ da $G\beta\gamma$ leva a ativação de alvos múltiplos, incluindo Rho, quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e efetores AKT (proteína quinase serina/treonina), levando a quimiotaxia, sobrevivência e/ou proliferação celular, aumento de cálcio intracelular e a transcrição de genes alvos (Figura 18) (TEICHER; FRICKER, 2010). Independente de proteína G, CXCR4 também ativa os transdutores de sinal/quinases ativadas por Janus e a transcrição via JAK/STAT (TEICHER; FRICKER, 2010; DOMANSKA et al., 2013). Adicionalmente, a ativação do eixo CXCR4-CXCL12 resulta em resistência do tumor as terapias convencionais pois promove a sobrevivência de células do câncer, invasão e um fenótipo de células iniciando o tumor (células-tronco do câncer) (TERASAKI et al., 2011). Também, CXCR4 induz a liberação do fator de crescimento endotelial vascular no tumor que promove o aumento da permeabilidade vascular e angiogênese, facilitando a migração e propriedades invasivas de células do tumor, promovendo as metástases (TEICHER; FRICKER, 2010).

Portanto, além da função de estimular o crescimento do tumor e promover metástase, através da ligação ao CXCL12, o CXCR4 também pode se ligar ao SDF-1 (*α-chemokine stromal-derived factor-1*) e facilitar a manutenção e migração de células-tronco do seu local de origem até o seu destino final, podendo ser considerado como marcador de migração de células-tronco (KUCIA et al., 2005; MILLER; BANISADR; BHATTACHARYYA, 2008).

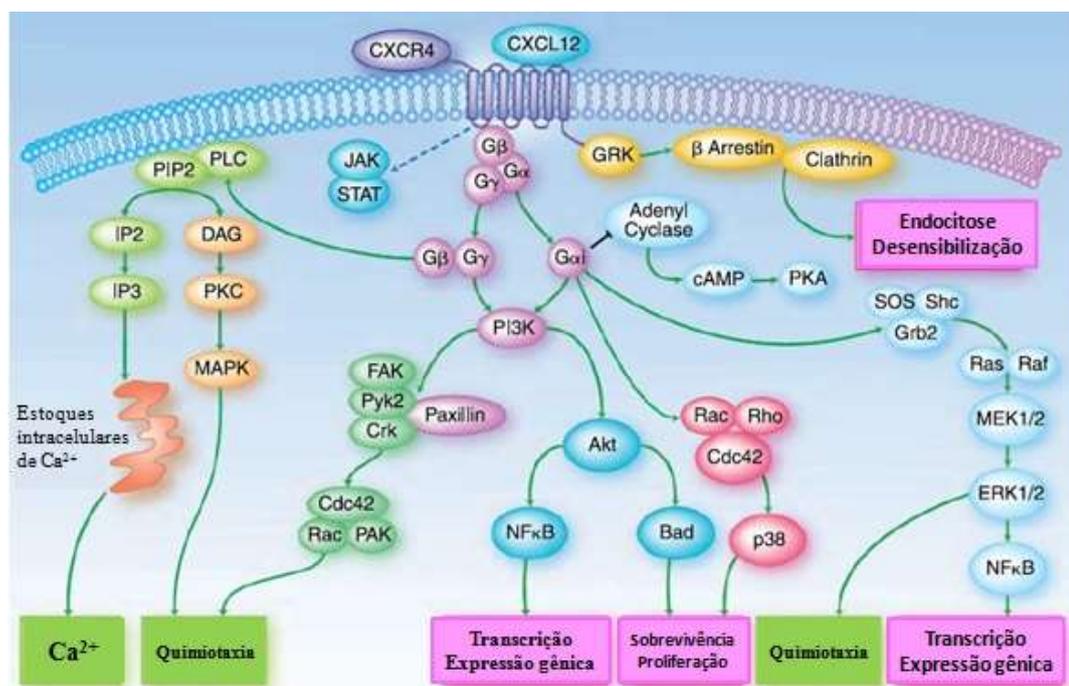


Figura 18 – Esquema das vias de sinalização intracelulares de CXCR4.
Fonte: Adaptado de Teicher; Fricker, 2010.

5.3 – CD44

A glicoproteína CD44 (*Cluster of Differentiation 44*), previamente chamada de Pgp-1, ECMRIII, antígeno Hermes e Ly-24, H-CAM e gp90^{Hermes}, é uma molécula de superfície, presente na membrana celular, que foi primeiro identificada em leucócitos, em 1983, por Gallatin e colaboradores e três anos depois, Stamenkovic et al. (1989) detectaram a sua presença em células-tronco do câncer. Atualmente, CD44 é considerado um marcador de células-tronco em estágios mais tardios de diferenciação (LUO et al., 2002; YU et al., 2012; MIMÉAULT; BATRA, 2014).

O gene que codifica CD44 é mapeado no braço curto do cromossomo 11, e é composto de dois grupos de éxons (Figura 19). Um grupo compreende os éxons de 1-5 e 16-10, que são ligados para formar um transcrito que codifica a isoforma padrão dessa proteína, a CD44 padrão (CD44s); já o outro grupo inclui 10 éxons variáveis 6-15, também conhecidos como v1-10, que podem ser ligados alternativamente, pelo processo de *splicing alternativo*,

nos exons padrões, no sítio de inserção entre os exons 5 a 16. Esses exons podem codificar várias proteínas diferentes, dando origem as isoformas variáveis dessa proteína, chamada de CD44 variável (CD44v) (GOODISON; URQUIDI; TARIN, 1999).

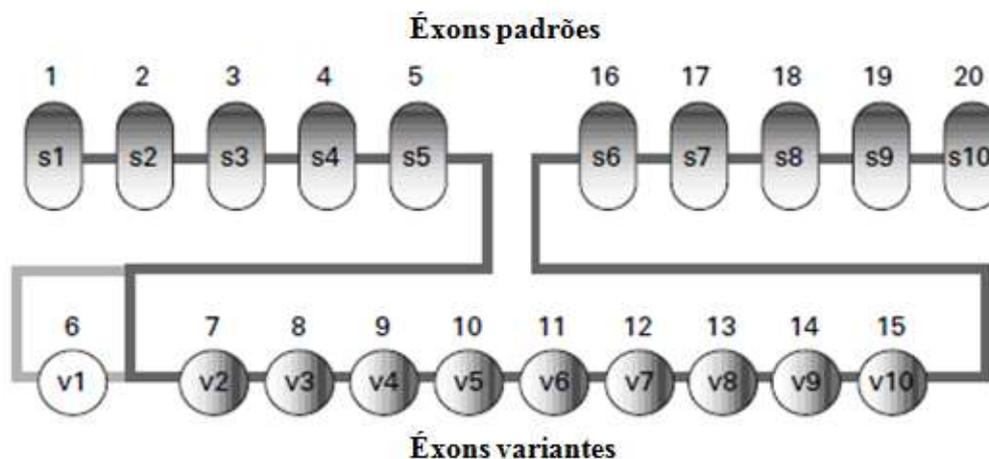


Figura 19 – Esquema simplificado da estrutura do gene CD44. s: *standard* – padrão; v: *variant* – variante. Fonte: Goodison; Urquidi; Tarin, 1999.

A proteína CD44 padrão, que é a mais abundante, apresenta 37kDa de peso molecular e é uma proteína transmembrânica, composta de três regiões: um domínio citoplasmático C-terminal, um domínio transmembrânico e um domínio extracelular (Figura 20). A região citoplasmática é codificada pelos exons 18, 19 e 20 e é responsável pela interação com o citoesqueleto celular, sendo requerida para distribuição de CD44 em áreas específicas da célula e também para aumentar a longevidade da molécula. O domínio transmembrânico hidrofóbico é codificado pelo éxon 18 e é 100% conservado entre as espécies de mamíferos. Já o domínio extracelular, N-terminal, maior parte desta proteína, é subdividido em regiões conservadas e não-conservadas (variantes). A região conservada é codificada pelos exons 1-5 e é o local de interação com seus ligantes, o ácido hialurônico, seu principal ligante e os ligantes alternativos, tais como, condroitina, colágeno, laminina e fibronectina (GOODISON; URQUIDI; TARIN, 1999).

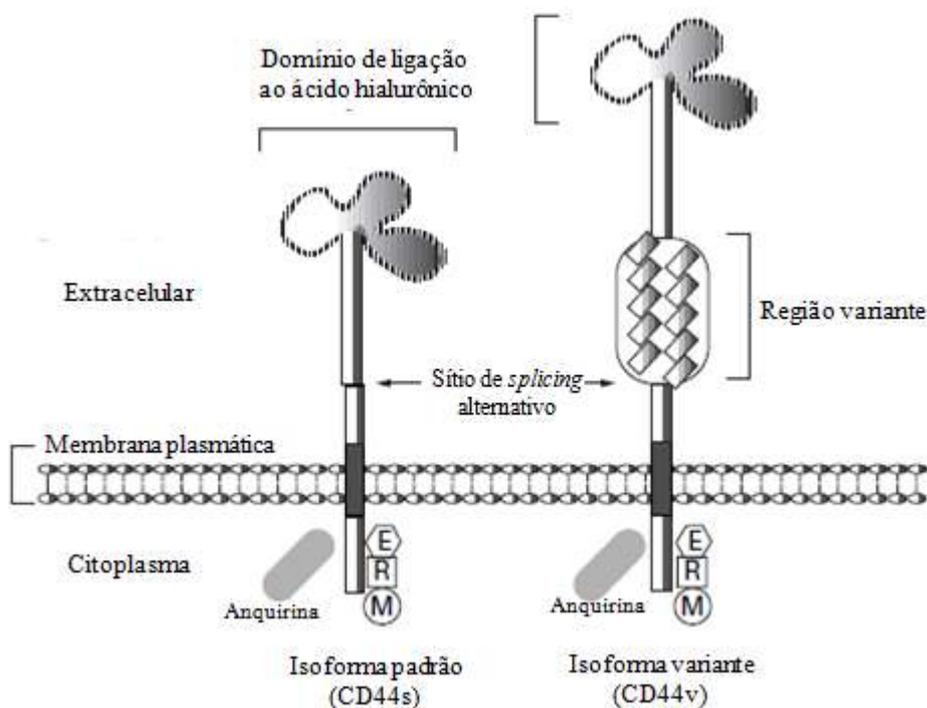


Figura 20 – Estrutura da proteína CD44.

Fonte: Adaptado de Goodison; Urquidi; Tarin, 1999.

A figura 21 representa as vias de sinalização de CD44 no câncer. Por esta figura é possível observar que a ligação de CD44 ao ácido hialurônico ativa a tirosina quinase de HER2 e a quinase não-receptor e também as proteínas RHOA e Rac1. O ácido hialurônico também promove a associação de formas de CD44 com proteínas do citoesqueleto, tais como as proteínas anquirinas e ERM. A ativação dessas vias de sinalização juntas leva as alterações no comportamento do tumor, tais como migração e invasão, adesão de células tumorais e proliferação e crescimento tumoral (TURLEY; NOBLE; BOURGUIGNON, 2002). Adicionalmente, estudos têm mostrado que CD44 é envolvido no fenótipo migratório para instalação de células-tronco do câncer em tecidos distantes, processo chamado de transição epitelial-mesenquimal, e também na adesão celular, extravasamento, proliferação e resistência a apoptose, levando a resistência das células-tronco do câncer a terapia (MARHABA et al., 2008; ZÖLLER, 2011).

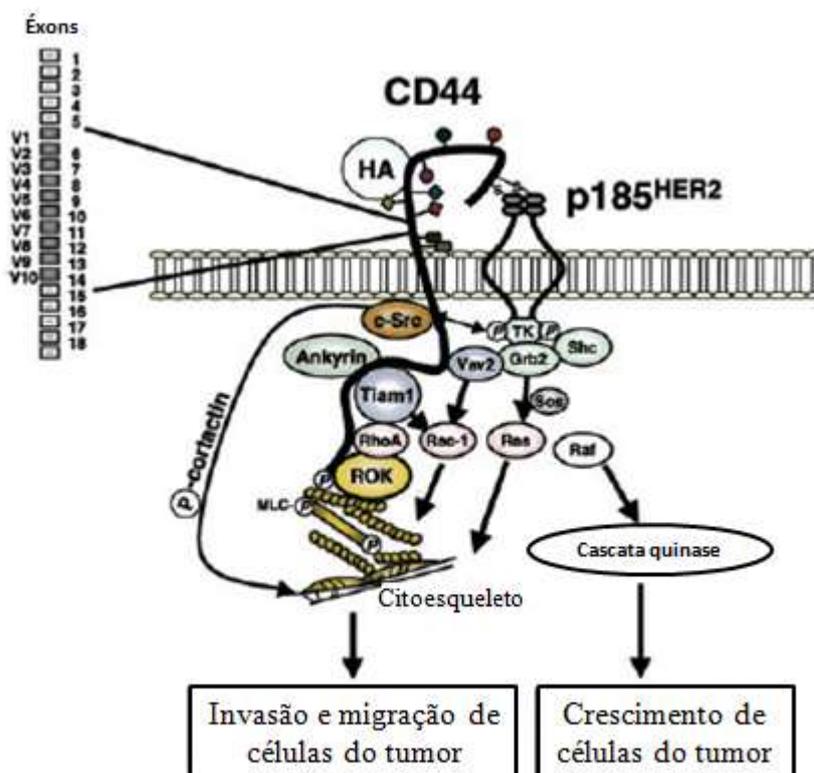


Figura 21 – Vias de sinalização de CD44 no câncer.
Fonte: Adaptado de Turley; Noble; Bourguignon., 2002.

5.4 – OLIG2

A família de genes *OLIG* (Genes de fatores de transcrição de oligodendrócito - *Oligodendrocyte transcription factor gene*), representados pelo *OLIG1*, *OLIG2* e *OLIG3*, codifica proteínas de mesmo nome, que são fatores de transcrição hélice alça hélice básicos (bHLH - *basic helix-loop-helix*) – que respondem a sinalização *sonic hedgehog* (Shh) e que foram inicialmente identificados como fatores de transcrição específicos da linhagem oligodendroglial, daí seu nome, OLIG (LIGON et al., 2006; MEIJER et al., 2012). Os genes *OLIG1* e *OLIG2* estão localizados no cromossomo 21 a 40kb um do outro, já o gene *OLIG3* é localizado no cromossomo 6. A expressão de *OLIG1* e *OLIG2* é ampla durante e após o desenvolvimento do SNC, em células da linhagem oligodendroglial madura e em células progenitoras multipotentes do cérebro adulto, enquanto que o *OLIG3* apresenta expressão mais pronunciada durante o desenvolvimento do SNC e apesar de ainda ser pouco conhecida a sua função, parece ser relacionada ao desenvolvimento do cordão espinal dorsal (LIGON et al., 2006; MEIJER et al., 2012).

Paralelamente aos estudos de expressão, um crescente número de informações sobre o desenvolvimento e diferenciação do SNC tem elucidado alguns pontos sobre a regulação e

função dos fatores de transcrição OLIG1 e OLIG2. Apesar de muitos pontos ainda estarem obscuros quanto a função desses fatores de transcrição, há um consenso de que OLIG1 e OLIG2, expressos no prosencéfalo no período embrionário e pós-natal, são importantes na decisão do destino celular em células progenitoras gliais, através de intrincadas interações com outras moléculas, intrínsecas e extrínsecas, durante o desenvolvimento (KIMELBERG, 2004; MARSHALL; NOVITCH; GOLDMAN, 2005; LIGON et al., 2007). O fator de transcrição OLIG1 é envolvido no desenvolvimento de oligodendrócitos, em especial no processo de maturação dessas células, na etapa de mielinização (Figura 22 e figura 23). Assim como o OLIG1, OLIG2 também é associado ao desenvolvimento dessas células, contudo, é especialmente envolvido nas etapas iniciais de destino celular, promovendo a expansão do *pool* de células progenitoras (Figura 22) e a especialização de outras células gliais (Figura 22 e figura 24). Isso ocorre através da inibição das fases finais da maturação dos astrócitos, da diferenciação de oligodendrócitos ou da repressão de um fenótipo neuronal em células progenitoras da zona subventricular, através da inibição de genes alvos, tais como Nkx2.2 e Ngn2, que servem como repressores de diferenciação de neurônio motor, assim, permitindo ou promovendo o surgimento de glioblastos, que são células precursoras gliais (Figura 24) (HOANG-XUAN et al., 2002; LIGON et al., 2007; MEIJER et al., 2012). Em resumo, OLIG2 direciona uma decisão do destino da celular glial ou neuronal em progenitoras da zona subventricular. Além disso, na maturação de células gliais, pode promover a diferenciação de oligodendrócitos e regular a maturação dos astrócitos.



Figura 22 – Funções de OLIG1 e OLIG2 no desenvolvimento do SN.
Fonte: Adaptado de Meijer et al., 2012.

Identificação de alterações moleculares associadas à expressão de CD133, CXCR4, CD44 e OLIG2 e ao padrão de metilação em promotor de CDKN2A em tumores astrocíticos

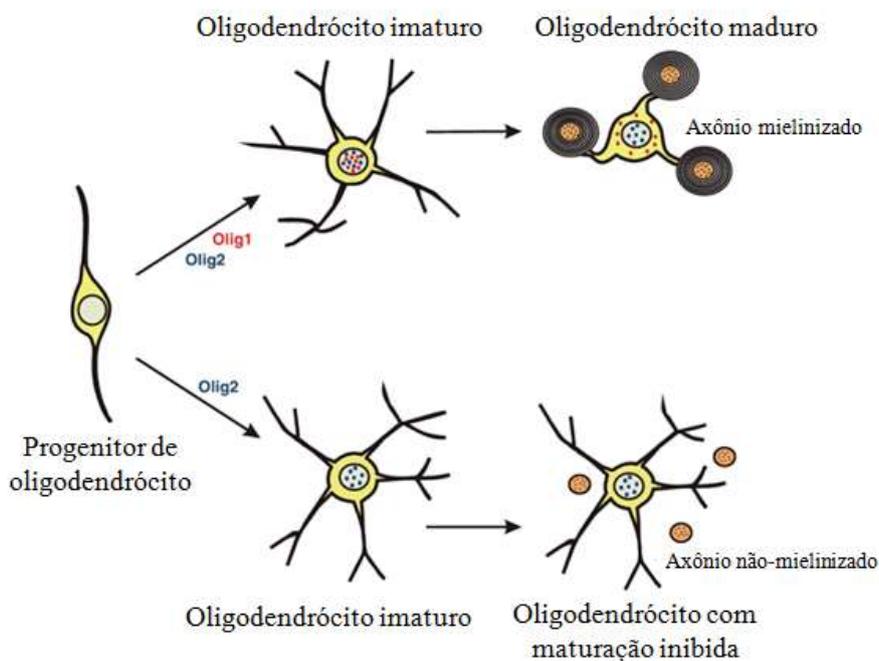


Figura 23 – Diferenciação do oligodendrócito.
Fonte: Adaptado de Balabanov; Popko, 2005.

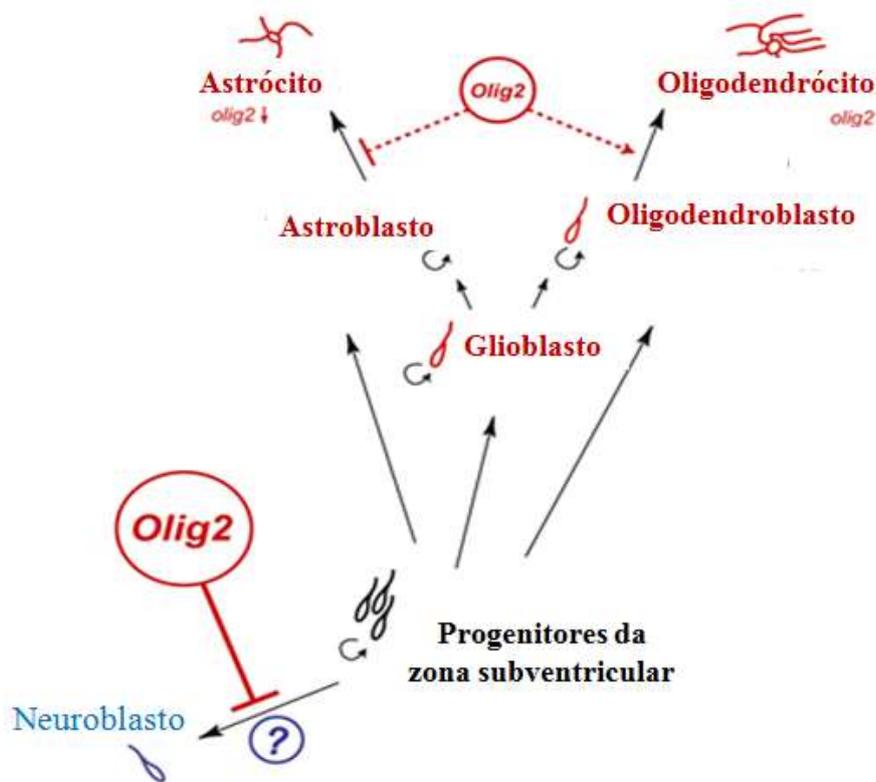


Figura 24 – Modelo de especificação celular na zona subventricular, mostrando a atuação de OLIG2 na repressão do fenótipo neuronal e promoção de glioblastos.
Fonte: Adaptado de Marshall; Novitsch; Goldman., 2005.

A proteína OLIG2 vem ganhando atenção por está relacionada a tumores humanos, através da regulação do crescimento de células-tronco/progenitoras no câncer (LIGON et al., 2007; MATHIVANAN et al., 2007). Os primeiros estudos relativos à expressão de OLIG2, devido a sua relação com o desenvolvimento dos oligodendrócitos, foram na direção da viabilidade dessa proteína ser usada como um marcador específico para os tumores oligodendogliomas. De fato, os primeiros estudos mostraram que esse gene era altamente expresso nesses tumores e muito pouco expressos nos astrocitomas (MARIE et al., 2001; HOANG-XUAN et al., 2002). Entretanto, os estudos posteriores identificaram expressão alta de OLIG2 em vários gliomas, incluindo astrocitomas (LIGON et al., 2004; RIEMENSCHNEIDER; KOY; REIFENBERGER, 2004; TANAKA et al., 2008). Nos gliomas, Ligon et al. (2007) sugere que o OLIG2 atua suprimindo diretamente a transcrição da proteína p21, um inibidor de quinase dependente de ciclina, que atua inibindo a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb) e como consequência leva a proliferação celular desordenada (Figura 25). Tem sido encontrada uma porcentagem aumentada da pRb fosforilada em gliomas malignos e isto poderia ser devido a inativação de p21 via OLIG2 (LIGON et al., 2007).

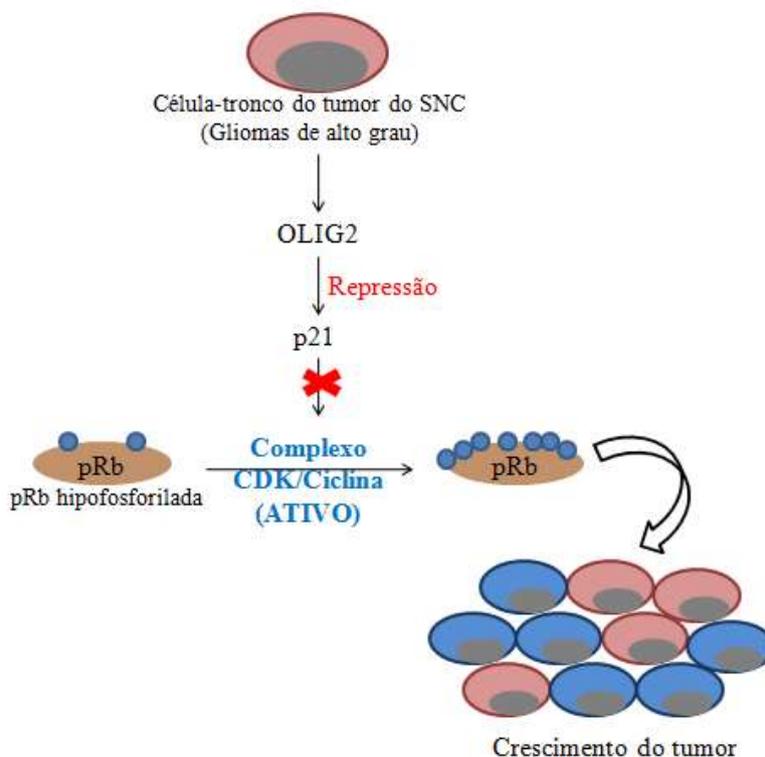


Figura 25 – Mecanismo de atuação do OLIG2 em gliomas, segundo LIGON et al., 2007.

II - JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC), a despeito da baixa prevalência, constituem a principal causa de mortalidade por câncer em crianças e entre adultos jovens, com consideráveis índices de morbi-mortalidade entre indivíduos idosos, e dentre estes tumores, os astrocitomas são de especial interesse por serem o mais comum tipo histológico. Um significativo conhecimento sobre esses tumores tem sido gerado devido aos estudos moleculares, delineando alterações genéticas e epigenéticas específicas correlacionadas com distintos graus dos astrocitomas (grau I a IV). Dentre estas alterações, uma parte destes tumores mostram anormalidades genéticas envolvendo componentes da via p53, tais como o p16^{INK4A}, as quais convergem para uma ruptura da via da proteína retinoblastoma (Rb). A proteína p16 (gene *CDKN2A*) merece destaque devido a sua alta inativação em vários tumores humanos e embora a hipermetilação em promotor seja apontado como o principal mecanismo de inativação desse gene, em astrocitomas há ainda questões controversas e poucos estudos tem avaliado este processo considerando a expressão e padrão de metilação de acordo com aspectos clinicopatológicos, como grau tumoral e idade. Adicionalmente, esses tumores mostram uma complexidade biológica peculiar e apesar da origem celular dos astrocitomas ser desconhecida, a presença de células-tronco e progenitoras nestes tumores é bem estabelecida, especialmente em glioblastomas e parecem estar envolvidas na tumorigênese dos astrocitomas. Entre os marcadores de células-tronco/progenitoras, CD133, CXCR4 e CD44 são relacionados a formação, migração e crescimento de gliomas, diferente do OLIG2 que parece estar envolvido com destino celular. Contudo, não há estudos, até essa data, que avaliem a expressão de todos esses marcadores juntos e relacionem ao grau de malignidade do tumor e aos outros parâmetros clinicopatológicos. A presença desses marcadores aponta uma utilidade potencial para identificar grupos de tumores os quais possam justificar algumas das vias moleculares com implicações terapêuticas.

III - OBJETIVOS

Geral:

- Investigar a expressão e o padrão de metilação em promotor de *CDKN2A* (p16^{INK4A}) na progressão maligna de astrocitomas.
- Identificar se a presença de células tronco/progenitoras, considerando a expressão dos marcadores CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2, podem definir subpopulações de células, os quais podem ser utilizados como possíveis marcadores prognósticos dos astrocitomas.

Específicos:

- Detectar a frequência de metilação na região promotora, bem como a expressão do gene *CDKN2A* em tumores astrocíticos de diferentes graus de malignidade correlacionando com os dados clínicos e histopatológicos;
- Detectar a frequência dos marcadores CD133, CXCR4, CD44 e OLIG2 em uma série de tumores astrocíticos de vários graus de malignidade;
- Avaliar os padrões de expressão dos marcadores CD133, CXCR4, CD44 e OLIG2 isolados e/ou agrupados nos diferentes graus de malignidade dos astrocitomas e de acordo com os parâmetros clínicos.

IV - REFERÊNCIAS

AHMED, A.U.; AUFFINGER, B.; LESNIAK, M.S. Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies. **Expert Rev Neurother.**, v. 13, nº 5, p. 545-55, 2013.

AHMED, R.; OBORSKI, M.J.; HWANG, M.; LIEBERMAN, F.S.; MOUNTZ, J.M. Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. **Cancer Manag Res.**, v. 6, p. 149-70, 2014.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da célula*. 5ª edição. Editora Artmed. Porto Alegre, 2010.

ALKHATIB, G. The biology of CCR5 and CXCR4. **Curr Opin HIVAIDS**, v. 4, nº 2, p. 96-103, 2009.

ALTANER, C. Glioblastoma and stem cells. **Neoplasma**, v. 55, nº 5, p. 369-74, 2008.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone. **J Neurosci.**, v. 22, nº 3, p. 629-34, 2002.

BAILEY, P.; CUSHING, H. A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Lippincott, Philadelphia, 1926.

BALABANOV, R.; POPKO, B. Myelin repair: developmental myelination redux? **Nature Neuroscience**, v. 8, nº 3, p. 262-264, 2005.

BONDY, M.L.; SCHEURER, M.E.; MALMER, B.; BARNHOLTZ-SLOAN, J.S.; DAVIS, F.G.; IL'YASOVA, D.; KRUCHKO, C.; MCCARTHY, B.J.; RAJARAMAN, P.; SCHWARTZBAUM, J.A.; SADETZKI, S.; SCHLEHOFER, B.; TIHAN, T.; WIEMELS, J.L.; WRENSCH, M.; BUFFLER, P.A. Brain Tumor Epidemiology Consortium. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. **Cancer**, v. 113, p. 1953-68, 2008.

CAIRNCROSS, G.; WANG, M.; SHAW, E.; JENKINS, R.; BRACHMAN, D.; BUCKNER, J.; FINK, K.; SOUHAMI, L.; LAPERRIERE, N.; CURRAN, W.; MEHTA, M. Phase III trial

of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. **J Clin Oncol.**, v. 31, nº 3, p. 337–343, 2013.

CAMPOS, B.; HEROLD-MENDE, C.C. Insight into the complex regulation of CD133 in glioma. **Int J Cancer**, v. 128, nº 3, p. 501-10, 2011.

CARRASCO-GARCIA, E.; SAMPRON, N.; ALDAZ, P.; ARRIZABALAGA, O.; VILLANUA, J.; BARRENA, C.; RUIZ, I.; ARRAZOLA, M.; LAWRIE, C.; MATHEU, A. Therapeutic strategies targeting glioblastoma stem cells. **Recent Pat Anticancer Drug Discov.**, v. 8, nº 3, p. 216-27, 2013.

COBBS, C.; HARKINS, L.; SAMANTA, M.; GILLESPIE, G.Y.; BHARARA, S.; KING, P.H.; NABORS, L.B.; COBBS, C.G.; BRITT, W.J. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. **Cancer Res.**, v. 62, nº 12, p. 3347 – 3350, 2002.

CORBEIL, D.; ROPER, K.; FARGEAS, C.A.; JOESTER, A.; HUTTNER, W.B. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. **Traffic.**, v. 2, nº 2, p. 82-91, 2001.

CORLE, C.; MAKALE, M.; KESARI, S. Cell phones and glioma risk: a review of the evidence. **J Neurooncol.**, v. 106, nº 1, p. 1-13, 2012.

CROWE, D.L.; PARSA, B.; SINHA, U.K. Relationships between stem cells and cancer stem cells. **Histol Histopathol.**, v. 19, nº 2, p. 505-9, 2004.

CURTIS, M.A.; LOW, V.F.; FAULL, R.L. Neurogenesis and progenitor cells in the adult human brain: a comparison between hippocampal and subventricular progenitor proliferation. **Dev Neurobiol.**, v. 72, nº 7, p. 990-1005, 2012.

DAHLROT, R.H.; HERMANSEN, S.K.; HANSEN, S.; KRISTENSEN, B.W. What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 6, nº 3, p. 334-48, 2013.

DAUMAS-DUPORT, C.; VARLET, P. Dysembryoplastic neuroepithelial tumors. **Rev Neurol (Paris)**, v. 159, p. 622-636, 2003.

DIMOV, I.; TASIĆ-DIMOV, D.; CONIĆ, I.; STEFANOVIC, V. Glioblastoma multiforme stem cells. **Scientific World Journal**, v. 11, p. 930-58, 2011.

DOMANSKA, U.M.; KRUIZINGA, R.C.; NAGENGAST, W.B.; TIMMER-BOSSCHA, H.; HULS, G.; DE VRIES, E.G.; WALENKAMP, A.M. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. **Eur J Cancer**, v. 49, n° 1, p. 219-30, 2013.

DZIURZYNSKI, K.; CHANG, S.M.; HEIMBERGER, A.B.; KALEJTA, R.F.; MCGREGOR DALLAS, S.R.; SMIT, M.; SOROCEANU, L.; COBBS, C.S. HCMV and Gliomas Symposium. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. **Neuro Oncol.**, v. 14, n° 3, p. 246-55, 2012.

ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med.**, v. 4, n° 11, p. 1313–1317, 1998.

FAN, X.; SALFORD, L.G.; WIDEGREN, B. Glioma stem cells: evidence and limitation. **Semin Cancer Biol.**, v. 17, n° 3, p. 214-8, 2007.

FENG, Y.; BRODER, C.C.; KENNEDY, P.E.; BERGER, E.A. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science**, v. 272, p. 872-877, 1996.

FUEYO, J.; GOMEZ-MANZANO, C.; BRUNER, J.M.; SAITO, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, W.; LEVIN, V.A.; YUNG, W.K.; KYRITSIS, A.P. Hypermethylation of the CpG island of p16/CDKN2 correlates with gene inactivation in gliomas. **Oncogene**, v. 13, n° 8, p. 1615-9. 1996.

FURNARI, F.B.; FENTON, T.; BACHOO, R.M.; MUKASA, A.; STOMMEL, J.M.; STEGH, A.; HAHN, W.C.; LIGON, K.L.; LOUIS, D.N.; BRENNAN, C.; CHIN, L.; DEPINHO, R.A.; CAVENEE, W.K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev.**, v. 21, n° 21, p. 2683-710, 2007.

FURUSATO, B.; MOHAMED, A.; UHLÉN, M.; RHIM, J.S. CXCR4 and cancer. **Pathol Int.**, v. 60, n° 7, p. 497-505, 2010.

GALLATIN, W.M.; WEISSMAN, I.L.; BUTCHER, E.C. A cell-surface molecule involved in organ specific homing of lymphocytes. **Nature**, v. 304, p. 30-34, 1983.

GLADSON, C.L.; PRAYSON, R.A.; LIU, W.M. The pathobiology of glioma tumors. **Annu Rev Pathol.**, v. 5, p. 33-50, 2010.

GÓMEZ-LÓPEZ, S.; LERNER, R.G.; PETRITSCH, C. Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. **Cell Mol Life Sci.**, v. 71, n° 4, p. 575-97, 2014.

GOODISON, S.; URQUIDI, V.; TARIN, D. CD44 cell adhesion molecules. **Mol Pathol.**, v. 52, n° 4, p. 189-96, 1999.

GOULD, E.; TANAPAT, P. Stress and hippocampal neurogenesis. **Biol Psychiatry.**, v. 46, n° 11, p. 1472-9, 1999.

GROSSE-GEHLING, P.; FARGEAS, C.A.; DITTFELD, C.; GARBE, Y.; ALISON, M.R.; CORBEIL, D.; KUNZ-SCHUGHART, L.A. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. **J Pathol.**, v. 229, n° 3, p. 355-78, 2013.

GU, J.; LIU, Y.; KYRITSIS, A.P.; BONDY, M.L. Molecular epidemiology of primary brain tumors. **Neurotherapeutics**, v. 6, n° 3, p. 427-35, 2009.

HE, J.; LIU, Y.; LUBMAN, D.M. Targeting glioblastoma stem cells: cell surface markers. **Curr Med Chem.**, v. 19, n° 35, p. 6050-5, 2012.

HEGI, M.E.; HAUSEN, A.Z.; EDI, D.R.; MALIN, G.; KLEIHUES, P. Hemizygous or homozygous deletion of the chromosomal region containing the p16INK4A gene is associated with amplification of the EGF receptor gene in glioblastomas. **Int J Cancer**, v. 73, n° 1, p. 57-63, 1997.

HEGI, M.E.; LIU, L.; HERMAN, J.G.; STUPP, R.; WICK, W.; WELLER, M.; MEHTA, M.P.; GILBERT, M.R. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. **J Clin Oncol.**, v. 26, n° 25, p. 4189–4199, 2008.

HOANG-XUAN, K.; AGUIRRE-CRUZ, L.; MOKHTARI, K.; MARIE, Y.; SANSON, M. OLIG-1 and 2 gene expression and oligodendroglial tumours. **Neuropathol Appl Neurobiol.**, v. 28, n° 2, p. 89-94, 2002.

HOANG-XUAN, K.; CAPELLE, L.; KUJAS, M.; TAILLIBERT, S.; DUFFAU, H.; LEJEUNE, J.; POLIVKA, M.; CRINIÈRE, E.; MARIE, Y.; MOKHTARI, K.; CARPENTIER, A.F.; LAIGLE, F.; SIMON, J.M.; CORNU, P.; BROËT, P.; SANSON, M.;

DELATTRE, J.Y. Temozolomide as initial treatment for adults with low-grade oligodendrogliomas or oligoastrocytomas and correlation with chromosome 1p deletions. **J Clin Oncol.**, v. 22, n° 15, p. 3133-8, 2004.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2014: Incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>.

IROLLO, E.; PIROZZI, G. CD133: to be or not to be, is this the real question? **Am J Transl Res.**, v. 5, n° 6, p. 563-581, 2013.

KIM, W.Y.; SHARPLESS, N.E. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. **Cell**, v. 127, n° 2, p. 265-75, 2006.

KIMELBERG, H.K. The problem of astrocyte identity. **Neurochem Int.**, v. 45, n° 2-3, p. 191-202, 2004.

KLEIHUES, P.; CAVENEE, W.K. World health organization classification of tumors: pathology and genetics of tumors of the central nervous system. Lyon: IARC Press, 2000.

KUCIA, M.; RECA, R.; MIEKUS, K.; WANZECK, J.; WOJAKOWSKI, W.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, J.; RATAJCZAK, M.Z. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. **Stem Cells**, v. 23, n° 7, p. 879-94, 2005.

LAIRD, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n° 4, p. 253-66, 2003.

LAU, S.K.; CHEN, Y.Y.; CHEN, W.G.; DIAMOND, D.J.; MAMELAK, A.N.; ZAIA, J.A.; WEISS, L.M. Lack of association of cytomegalovirus with human brain tumors. **Mod Pathol.**, v. 18, n° 6, p. 838– 843, 2005.

LIGON, K.L.; ALBERTA, J.A.; KHO, A.T.; WEISS, J.; KWAAN, M.R.; NUTT, C.L.; LOUIS, D.N.; STILES, C.D., ROWITCH, D.H. The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 63, n° 5, p. 499-509, 2004.

LIGON, K.L.; HUILLARD, E.; MEHTA, S.; KESARI, S.; LIU, H.; ALBERTA, J.A.; BACHOO, R.M.; KANE, M.; LOUIS, D.N.; DEPINHO, R.A.; ANDERSON, D.J.; STILES,

C.D.; ROWITCH, D.H. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. **Neuron.**, v. 53, nº 4, p. 503-17, 2007.

LIGON, K.L.; FANCY, S.P.; FRANKLIN, R.J.; ROWITCH, D.H. Olig gene function in CNS development and disease. **Glia**, v. 54, nº 1, p. 1-10, 2006.

LINOS, E.; RAINE, T.; ALONSO, A.; MICHAUD, D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. **J Natl Cancer Inst.**, v. 99, nº 20, p. 1544-1550, 2007.

LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; CAVENEE, W.K.; BURGER, P.C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B.W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO Classification of tumors of the Central Nervous System. **Acta Neuropathol.**, v. 114, nº 2, p. 97-109, 2007.

LUO, Y.; CAI, J.; LIU, Y.; XUE, H.; CHREST, F.J.; WERSTO, R.P.; RAO, M. Microarray analysis of selected genes in neural stem and progenitor cells. **J Neurochem.**, v. 83, nº 6, p. 1481-97, 2002.

MACHADO, A. Neuroanatomia Funcional. 2ª ed. Editora Atheneu, 2000.

MARHABA, R.; KLINGBEIL, P.; NUEBEL, T.; NAZARENKO, I.; BUECHLER, M.W.; ZOELLER, M. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. **Curr Mol Med.**, v. 8, nº 8, p. 784-804, 2008.

MARIE, Y.; SANSON, M.; MOKHTARI, K.; LEURAUD, P.; KUJAS, M.; DELATTRE, J.Y.; POIRIER, J.; ZALC, B.; HOANG-XUAN, K. OLIG2 as a specific marker of oligodendroglial tumour cells. **Lancet.**, v. 358, nº 9278, p. 298-300, 2001.

MARKO, N.F.; WEIL, R.J. The molecular biology of WHO grade I astrocytomas. **Neuro Oncol.**, v. 14, nº 12, p. 1424-31, 2012.

MARSHALL, C.A.; NOVITCH, B.G.; GOLDMAN, J.E. Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. **J Neurosci.**, v. 25, nº 32, p. 7289-98, 2005.

MATHIVANAN, J.; ROHINI, K.; GOPE, M.L; ANANDH, B.; GOPE, R. Altered structure and deregulated expression of the tumor suppressor gene retinoblastoma (RB1) in human brain tumors. **Mol Cell Biochem.**, v. 302, nº 1-2, p. 67-77, 2007.

MEIJER, D.H.; KANE, M.F.; MEHTA, S.; LIU, H.; HARRINGTON, E.; TAYLOR, C.M.; STILES, C.D.; ROWITCH, D.H. Separated at birth? The functional and molecular divergence of OLIG1 and OLIG2. **Nat Rev Neurosci.**, v. 13, nº 12, p. 819-31, 2012.

MILLER, R.J.; BANISADR, G.; BHATTACHARYYA, B.J. CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. **J Neuroimmunol.**, v. 198, nº 1-2, p. 31-8, 2008.

MIMEAULT, M.; BATRA, S.K. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 23, nº 2, p. 234-54, 2014.

MIZRAK, D.; BRITTAN, M.; ALISON, M. CD133: molecule of the moment. **J Pathol.**, v. 214, nº 1, p. 3-9, 2008.

MODREK, A.S.; BAYIN, N.S.; PLACANTONAKIS, D.G. Brain stem cells as the cell of origin in glioma. **World J Stem Cells**, v. 6, nº 1, p. 43-52, 2014.

OMURO, A.; DeANGELIS, L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas. **JAMA.**, v. 310, nº 17, p. 1842-1850, 2013.

OSTROM, Q.T.; GITTLEMAN, H.; FARAH, P.; ONDRACEK, A.; CHEN, Y.; WOLINSKY, Y.; STROUP, N.E.; KRUCHKO, C.; BARNHOLTZ-SLOAN, J.S. CBTRUS statistical reports: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro-Oncology**, v. 15, p. i1-ii56, 2013.

PINE, S.R.; RYAN, B.M.; VARTICOVSKI, L.; ROBLES, A.I.; HARRIS, C.C. Microenvironmental modulation of asymmetric cell division in human lung cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, nº 5, p. 2195–200, 2010.

POLTERMANN, S.; SCHLEHOFER, B.; STEINDORF, K.; SCHNITZLER, P.; GELETNEKY, K.; SCHLEHOFER, J.R. Lack of association of herpesviruses with brain tumors. **J Neurovirol.**, v. 12, nº 2, p. 90–99, 2006.

PRESTEGARDEN, L.; ENGER, P.O. Cancer stem cells in the central nervous system - a critical review. **Cancer Res.**, v. 70, nº 21, p. 8255-8, 2010.

REIFENBERGER, G.; COLLINS, V.P. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **J Mol Med (Berl)**, v. 82, nº 10, p. 656-70, 2004.

REIFENBERGER, J.; REIFENBERGER, G.; LIU, L.; JAMES, C.D.; WECHSLER, W.; COLLINS, V.P. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. **Am J Pathol.**, v. 145, n° 5, p. 1175–1190, 1994.

RIEMENSCHNEIDER, M.J.; KOY, T.H.; REIFENBERGER, G. Expression of oligodendrocyte lineage genes in oligodendroglial and astrocytic gliomas. **Acta Neuropathol.**, v. 107, n° 3, p. 277-82, 2004.

ROJAS, M.A.; BERTHOLDO, D.; CASTILLO, M. Stem cells: implications in the development of brain tumors. **Radiologia**, v. 54, n° 3, p. 221-30, 2012.

SABATIER, J.; URO-COSTE, E.; POMMEPUY, I.; LABROUSSE, F.; ALLART, S.; TRÉMOULET, M.; DELISLE, M.B.; BROUSSET, P. Detection of human cytomegalovirus genome and gene products in central nervous system tumours. **Br J Cancer**, v. 92, n° 4, p. 747 – 750, 2005.

SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J.N.; REARDON, D.A. Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma. **Neurol Clin.**, v. 25, n° 4, p. 1111-39, 2007.

SCHNEIDER, T.; MAWRIN, C.; SCHERLACH, C.; SKALEJ, M.; FIRSCHING, R. Gliomas in adults. **Dtsch Ärztebl Int.**, v. 107, n° 450, p. 799-808, 2010.

SINGH, S.K.; CLARKE, I.D.; HIDE, T.; DIRKS, P.B. Cancer stem cells in nervous system tumors. **Oncogene**, v. 23, n° 43, p. 7267-73, 2004.

STAMENKOVIC, I.; AMIOT, M.; PESANDO, J.M.; SEED, B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. **Cell**, v. 56, n° 6, p. 1057-62, 1989.

STRATHDEE, G.; BROWN, R. Aberrant DNA methylation in cancer: potencial clinical interventions. **Expert Rev Mol Med.**, v. 4, n° 4, p. 1-17, 2002.

STUPP, R.; ROILA, F. Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol.**, v. 20, n° 4, p. 126-8, 2009.

TANAKA, Y.; SASAKI, A.; ISHIUCHI, S.; NAKAZATO, Y. Diversity of glial cell components in pilocytic astrocytoma. **Neuropathology**, v. 28, n° 4, p. 399-407, 2008.

TEICHER, B.A.; FRICKER, S.P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 16, nº 11, p. 2927-31, 2010.

TERASAKI, M.; SUGITA, Y.; ARAKAWA, F.; OKADA, Y.; OHSHIMA, K.; SHIGEMORI, M. CXCL12/CXCR4 signaling in malignant brain tumors: a potential pharmacological therapeutic target. **Brain Tumor Pathol.**, v. 28, nº 2, p. 89-97, 2011.

TURLEY, E.A.; NOBLE, P.W.; BOURGUIGNON, L.Y. Signaling properties of hyaluronan receptors. **J Biol Chem.**, v. 277, nº 7, p. 4589-92, 2002.

TYLER, J.K.; KADONAGA, J.T. The “dark side” of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. **Cell**, v. 99, nº 5, p. 443-6, 1999.

UCHIDA, N.; BUCK, D.W.; HE, D.; REITSMA, M.J.; MASEK, M.; PHAN, T.V.; TSUKAMOTO, A.S.; GAGE, F.H.; WEISSMAN, I.L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 97, nº 26, p. 14720-5, 2000.

VESCOVI, A.L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B.A. Brain tumour stem cells. **Nat Rev Cancer**, v. 6, nº 6, p. 425-36, 2006.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, nº 5, p. 639-48, 2004.

WAJED, S.A.; LAIRD, P.W.; DEMEESTER, T.R. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. **Ann Surg.**, v. 234, nº 1, p. 10-20, 2001.

WAKABAYASHI, T.; NATSUME, A.; HATANO, H.; FUJII, M.; SHIMATO, S.; ITO, M.; OGURA, M.; YOSHIDA, J. p16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas. **Neurosurgery**, v. 64, nº 3, p. 455-62, 2009.

WATANABE, T.; NAKAMURA, M.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Promoter hypermethylation and homozygous deletion of the p14ARF and p16INK4A genes in oligodendrogliomas. **Acta Neuropathol.**, v. 101, nº 3, p. 185-9, 2001.

WEI, Y.; JIANG, Y.; ZOU, F.; LIU, Y.; WANG, S.; XU, N.; XU, W.; CUI, C.; XING, Y.; LIU, Y.; CAO, B.; LIU, C.; WU, G.; AO, H.; ZHANG, X.; JIANG, J. Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 110, nº 17, p. 6829-34, 2013.

WEN, P.Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **N Engl J Med.**, v. 359, nº 5, p. 492-507, 2008.

WICK, W.; WELLER, M. Adjuvant therapy. **Recent Results Cancer Res.**, v. 171, p. 141-53, 2009.

YIN, A.H.; MIRAGLIA, S.; ZANJANI, E.D.; ALMEIDA-PORADA, G.; OGAWA, M.; LEARY, A.G.; OLWEUS, J.; KEARNEY, J.; BUCK, D.W. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. **J Blood**, v. 90, nº 12, p. 5002- 5012, 1997.

YU, X.; LIN, Y.; YAN, X.; TIAN, Q.; LI, L.; LIN, E.H. CD133, stem cells, and cancer stem cells: Myth or reality? **Curr Colorectal Cancer Rep.**, v. 7, nº 4, p. 253-259, 2011.

YU, Z.; PESTELL, T.G.; LISANTI, M.P.; PESTELL, R.G. Cancer stem cells. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 44, nº 12, p. 2144-51, 2012.

ZHANG, H.; LI, S.Y. Research progression of CD133 as a marker of cancer stem cells. **Chin J Cancer.**, v. 29, nº 3, p. 243-7, 2010.

ZÖLLER, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nat Rev Cancer.**, v. 11, nº 4, p. 254-67, 2011.

ZULCH, K.J. Histological typing of tumors of the central nervous systems. World Health Organization, nº 21. Geneva, 1979.

V - ANEXOS

ARTIGO 1: Detecção da expressão e status de metilação em promotor de CDKN2A

- *Os dados obtidos da análise da expressão e padrão de metilação em promotor de p16 foram associados aos dados clínicos e histopatológicos e geraram uma publicação na revista Int J Surg.*

Link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721661>.

ORIGINAL RESEARCH

International Journal of Surgery 11 (2013) 548–553

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Surgery

journal homepage: www.elsevier.com



Original research

CDKN2A promoter hypermethylation in astrocytomas is associated with age and sex

Markênia Kêlia Santos Alves^{a,*}, Mário Henrique Girão Faria^a,
Eduardo Henrique Cunha Neves Filho^a, Adriana Camargo Ferrasi^b,
Marta Inês de Moura Campos Pardini^b, Manoel Odorico de Moraes Filho^c,
Sílvia Helena Bares Rabenhorst^a

^aUniversidade Federal do Ceará, Department of Pathology and Forensic Medicine, Rua Alexandre Barreto, 948, Fortaleza, CE, CEP 60183-030 Fortaleza, Brazil^bUniversidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu Medical School, Molecular Biology Laboratory of Blood Transfusion Center, Centro de Saúde José de A. CEP 13.618-000 Botucatu, Brazil^cUniversidade Federal do Ceará, Department of Physiology and Pharmacology, Rua Coronel Nunes de Almeida, 1127, Fortaleza, CEP 60430-270 Fortaleza, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2013

Received in revised form

24 April 2013

Accepted 17 May 2013

Available online 27 May 2013

Keywords:

CDKN2A Methylation

p16

Expression

Age

Astrocytic tumors

ABSTRACT

CDKN2A promoter hypermethylation has been widely related to many cancers. In astrocytomas, although CDKN2A (p16^{INK4A} protein) is often inactivated, there are still some controversial issues regarding the mechanism by which this alteration occurs. Thus, we analyzed a series of astrocytomas to assess the association between CDKN2A expression and methylation of grade I–IV tumors (WHO) and clinicopathological parameters. DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded material of 33 astrocytic tumors was available for CDKN2A promoter methylation analysis and p16^{INK4A} expression by methylation-specific PCR and immunohistochemistry, respectively. A strong negative correlation between nuclear and cytoplasmic immunostaining and CDKN2A promoter methylation was found. Additionally, a significant negative correlation between CDKN2A promoter methylation and age was observed; also, female patients had statistically more CDKN2A methylated promoters ($p = 0.016$) than men. In conclusion, CDKN2A inactivation by promoter methylation is a frequent event in astrocytomas and it is related to the age and sex of patients.

© 2013 Surgical Associates Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The astrocytomas are the most common primary brain tumors, being classified according to their histological degree of malignancy by the World Health Organization (WHO) in grades I–IV. These categories result from the recognition of anaplasia findings, such as nuclear atypia, cell pleomorphism, mitotic activity, endothelial hyperplasia and necrosis.^{1,2}

Individually or in combination with genetic mechanisms, epigenetic alterations, such as aberrant hypermethylation of promoter regions, affect the expression of tumor suppressor genes and

DNA repair genes, leading to their silencing.³ Silenced expression of tumor suppressor genes or impairment of their products may result in loss of proliferative control, leading to the neoplastic process in the development of many human tumors.⁴

In astrocytomas, besides p53 and MGMT (a specific predictive biomarker of tumor responsiveness to chemotherapy with alkylating agents), the p16^{INK4A} (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A-CDKN2A) protein, encoded by the CDKN2A gene, is often inactivated.^{5,7} This protein is a cell cycle regulator involved in the inhibition of the formation of cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 or 6 complexes during the G1 phase (Gap1) of the cell cycle.⁶ Although, in most human tumors, gene promoter hypermethylation is a common mechanism of CDKN2A inactivation, in astrocytomas there are still some controversial issues.^{8–13} Also, few studies have evaluated this process considering the expression and the methylation status of this gene taking in account clinicopathological aspects, such as histological grade and age.^{8,9,14} Additionally,

* Corresponding author. Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Rua Alexandre Barreto, 948 Fortaleza, CEP 60183-030 Fortaleza, CE, Brazil. Tel.: +55 85 9824 0929; fax: +55 85 3242 5655.

E-mail address: markeniak@ufce.br (M.K.S. Alves).

ORIGINAL RESEARCH

550

M.E.S. Alvim et al. / International Journal of Surgery 11 (2013) 549–550

there are controversial issues concerning the nuclear/cytoplasmic localization of the p16^{INK4A} protein expression.^{15–17}

Therefore, in this study, we performed an analysis of CDKN2A expression and methylation status in a series of astrocytic tumors of different grades (WHO) from the state of Ceará, Brazil. We also investigated the relationship between these aspects and clinicopathological parameters.

2. Material and methods

2.1. Ethical issue and consent

The present study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Complex of the Federal University of Ceará under protocol 32/2004, respecting the Resolution 196/96 of the National Council of Health – Ministry of Health/Brazil. Ninety-three formalin-fixed paraffin-embedded astrocytic tumors from the archive of the BICOPSE[®] (Biotecnologia, Pesquisa e Serviços Ltda – Fortaleza, CE – Brazil), a private pathology laboratory which is reference in this field in our region, selected from the routine histopathological examinations performed between 2003 and 2011, were obtained. The samples were sliced at 5 µm thickness and processed for histopathological evaluation (hematoxylin–eosin stain), DNA extraction (for MS-PCR) and immunohistochemical analysis.

2.2. DNA extraction from paraffin-embedded specimens

All specimens included in this study were taken from paraffin-embedded tissue. Ten sections from each sample were obtained from the block with adequate precaution to prevent contamination between cases, including replacement of blade between each slide. Microsome buffers were cleaned using xylene to prevent contamination of tissue from one block to the next. Deparaffinization was performed through xylene baths at 65 °C, rehydrated with solutions of decreasing concentrations of ethanol and deionized water. DNA was extracted using a Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA). DNA quality was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis, and the amount was determined using the NanoDrop TM[®] 2000 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

2.3. Sodium bisulfite treatment and methylation-specific PCR (MS-PCR)

DNA extracted from paraffin-embedded tumor tissue was modified by sodium bisulfite to determine the methylation status of the CDKN2A gene by MS-PCR, as previously described by Farnak et al.¹⁸ The primer targeted to the promoter CDKN2A region were 5'-TTATTACAGGCTCGCGCGATCGG-3' (sense) and 5'-CAGCCCGAACCAGCCAGCCAGCA-3' (antisense) for the methylated CDKN2A (150 bp), and 5'-TTATTACAGGCTCGCGCGATCGG-3' (sense) and 5'-CAGCCCGAACCAGCCAGCCAGCA-3' (antisense) for the unmethylated CDKN2A (151 bp). PCR was performed in 25 µL reaction volume, containing 1 × Platinum Taq buffer, 3.0 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP, 0.54 mM of each primer set, 1 U Platinum Taq DNA Polymerase[®] (Invitrogen, Foster, CA, USA), and 50 ng of treated DNA.

DNA methylated *in vitro* by 5α-I-methylase[®] (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was used as a positive control. Water and DNA from peripheral lymphocytes of healthy donors were used as negative controls. The PCR products were resolved in a 0.8% non-denaturing polyacrylamide gel and subsequently subjected to silver staining.

2.4. Immunohistochemistry

Immunostaining was performed according to a previously described protocol.¹⁹ For antigen retrieval, deparaffinized sections were pretreated by heating in a microwave oven in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, for 20 min. After cooling, sections were immersed in PBS containing 3% hydrogen peroxide for 30 min to block endogenous peroxidase activity. Sections were then incubated in a moist chamber overnight at 4 °C with p16 primary antibody (clone D8D; dilution 1:40; Novocastra, United Kingdom). After rinsing with PBS, the slides were incubated with secondary antibody followed by streptavidin–biotin–peroxidase complex (LSAB + system; DakoCytomation[®], USA), both for 30 min at room temperature with a PBS wash between each step. The reaction was revealed with diaminobenzidine–tetrahydrochloride (DAB + system; DakoCytomation[®], USA), counterstained with Mayer's hematoxylin and mounted. A confirmed case of nodular p16-positive human breast carcinoma was used as a positive control. Controls of primary antibody specificity included omission or substitution of primary antibodies by normal bovine serum.

2.5. Immunostaining analysis

The immunohistochemical evaluation for p16 was performed independently by two experienced individuals using polarized light microscopy. Any conflicting results were jointly considered for a consensus description. Protein expression was quantified by manual counting of at least 1000 tumor cells in 10 different fields at a magnification of ×400. The labeling index (LI) represents the percentage of nuclear or cytoplasmic positive cells in each tumor sample and 0–4+ cases takes into account the intensity of immunocytochemical p16 stain expressed in values ranging from 0 to 3 (0 = no stain, 1 = weak, 2 = moderate and 3 = strong) following the methods described by McCarthy et al.²⁰ Only cases with LI equal to or greater than 25 were considered positive.

2.6. Statistical analysis

The statistical analyses were carried out using the SPSS version 15.0 program (Chicago, IL, USA). Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test (χ²) or Fisher's exact test. Correlations between immunostaining and CDKN2A promoter region methylation status were analyzed by Spearman's rank correlation coefficient. The results were considered statistically significant when the p-values were less than 0.05.

3. Results

3.1. Patient characteristics

A total of 99 samples of formalin-fixed paraffin-embedded astrocytic tumors of different grades (WHO classification): 17 (18.3%) grade I, 19 (20.4%) grade II, 14 (15.1%) grade III, and 43 (46.2%) glioblastomas were included in this study. The median age of the patients was 42 years (range, 2–81 years). A significant positive correlation ($p = 0.000$; $R = 0.677$) was observed between age and grade of malignancy of tumors. Among the cases, 50 were men and 43 women.

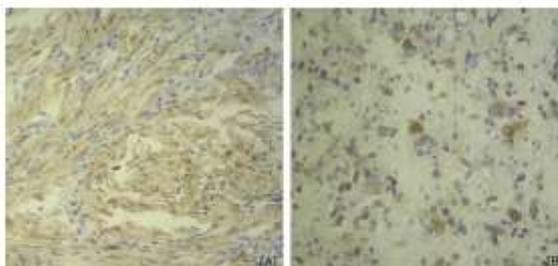


Fig. 1. Immunohistochemical staining for p16^{INK4A} protein in formalin-fixed paraffin-embedded astrocytic tumors (×400). (A) Diffuse Astrocytoma (WHO Grade II); moderate nuclear and cytoplasmic staining. (B) Glioblastoma (WHO Grade IV); diffuse staining.

ORIGINAL RESEARCH

MES, Aho et al. / International Journal of Surgery II (2013) 549–553

55

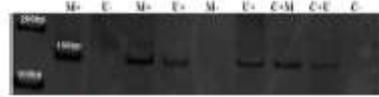


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in densitometric fragments of 150 bp and 151 bp for CDKN2A methylated and non-methylated, respectively. M – Methylated, E – Non-methylated.

3.2. Frequency and correlation between methylation in promoter region and expression of CDKN2A

Nuclear and/or cytoplasmic p16^{INK4A} positivity was found only in tumor cells. No staining was seen in non-tumor specimens. Examples of immunostaining for p16^{INK4A} and promoter methylation CDKN2A are illustrated in Figs. 1A,B and 2. The presence of promoter methylation in CDKN2A was observed in 65.6% (61/93) of the cases and expression of nuclear and cytoplasmic p16^{INK4A} protein were observed in 26.5% (25/93) and 51.6% (48/93) of the cases, respectively. The concurrence (+/+) and agreement (+/+ or -/-) of nuclear and cytoplasmic expression of p16^{INK4A} occurred in 20.4% (19/93) and 62.4% (58/93) of the analyzed cases, respectively. A high significant negative correlation was found between p16^{INK4A} nuclear or cytoplasmic immunopositivity and CDKN2A promoter region methylation ($p < 0.001$; $R = -0.378$ and $p < 0.001$; $R = -0.384$, respectively).

3.3. Relationship among promoter methylation and expression of the CDKN2A, age and sex of the patient

Fig. 3(A)–(B) shows the frequencies of CDKN2A promoter methylation and p16^{INK4A} expression stratified according to age and sex of the studied patients. From these figures, it is possible to observe that besides a relevant frequency of CDKN2A promoter methylation found in all age intervals, the younger patients (<30 years old) had the highest frequencies of methylated CDKN2A when compared to patients aged ≥ 30 , with statistical significant ($p = 0.002$). Indeed, correlation analysis showed a significant negative correlation between CDKN2A promoter methylation and age ($p = 0.047$, $R = -0.205$). Additionally, female patients had statistically more CDKN2A methylated promoters (33/43; 76.7%; $p = 0.056$) than men (Fig. 3(A)). No significant correlation between patient age and sex and p16^{INK4A} expression (nuclear or cytoplasmic) was found (Fig. 3(B)).

3.4. Relationship between promoter methylation and expression of CDKN2A and histological grade of tumors

The distribution of the p16^{INK4A} expression and methylation status according to tumor grade is shown in Table 1 and Fig. 4. The

high frequency of p16^{INK4A} nuclear negative cases was specially observed among the diffuse grade tumors. Additionally, grade I astrocytic tumors demonstrated median values of nuclear U significantly higher (Median U: 3.0) than diffuse tumors (grades II to IV) (Median U: 0.0) ($p < 0.01$) (Fig. 4).

Conversely, when analyzing the expression of cytoplasmic p16^{INK4A}, it was observed (Table 1 and Fig. 4) that the frequency of positivity, the median value of cytoplasmic U and the H score was positively correlated to histological tumor grade ($p = 0.001$, $R = 0.337$; $p < 0.001$, $R = 0.386$; $p < 0.001$, $R = 0.375$, respectively). Also, grade IV tumors showed higher U and H5 median values than the other grades, with statistical significance ($p < 0.001$).

No correlation between tumor grade and CDKN2A promoter methylation was observed (Table 1).

4. Discussion

In many human tumors, the inactivation of the tumor suppressor p16^{INK4A} protein by promoter hypermethylation of its coding gene is a frequent event and it has been associated with the carcinogenesis process.^{23,22} Up to date, there are only few studies on astrocytomas addressing mechanisms that may lead to p16 inactivation, presenting controversial results.^{20,11,23–25} Additionally, these studies did not evaluate the data taking the immunopositivity and the methylation status of the CDKN2A gene combined according to histological and clinical aspects.

Similar to other studies,^{1,26} our study found that only 26.5% of the tumors showed nuclear p16^{INK4A} immunopositivity. Additionally, the positivity of p16^{INK4A} was higher in gliocytic tumors than in the diffuse ones, which could represent a way to hinder the tumorigenic process, since these tumors present benign features, with minor molecular modifications.^{1,27} On the other hand, 51.6% of the tumors were p16^{INK4A} cytoplasmic immunopositive. The concurrence or agreement maintained between p16^{INK4A} nuclear and cytoplasmic staining indicates that cytoplasmic staining was specific and not artifactual. According to Liang et al.,²⁸ cytoplasmic staining indicates the accumulation of this protein in the cytoplasm, caused by its phosphorylation mediated by protein kinase B, oncogenetically activated, which blocks the recognition of its sites by nuclear importation factors. In this study, p16^{INK4A} cytoplasmic staining was positively correlated to tumor grade, suggesting that the greater genomic instability of the higher grade tumors²⁷ could lead to the expression of p16^{INK4A}; however, due to the acquisition of new molecular modifications, p16^{INK4A} nuclear importation could be blocked, explaining our findings.

Homozygous deletion has been described as the inactivating mechanism of the CDKN2A gene in gliomas. However, some studies have found CDKN2A promoter methylation in astrocytic tumors.^{8,10,13,25,29} Among the studies related to the CDKN2A promoter methylation in astrocytomas, some publications found a very low

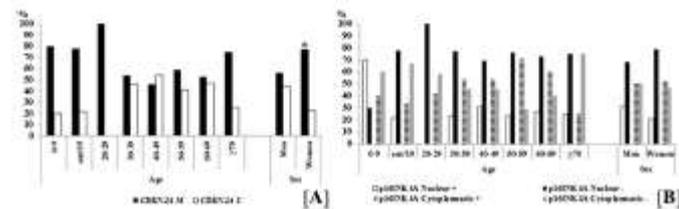


Fig. 3. Response of CDKN2A methylation status (A) and expression (B) according to age and sex distribution of the 93 patients studied. * $p < 0.05$.

ORIGINAL RESEARCH

552

MKS, Alves et al. / International Journal of Surgery 11 (2013) 549–552

Table 1
Positive Index of p10^{CDKN2A} (Nuclear and cytoplasmic) immunostaining and CDKN2A promoter methylation according to histological classification of the cases studied (n = 93).

		WHO histological classification					Diffuse (%)	Total
		NT (%)	I (%)	II (%)	III (%)	IV (%)		
p10 ^{CDKN2A} (Nuclear)	(+)	0(0)	7(41)	2(10)	3(21)	13(30)	18(24)	2.5
	(-)	5(100)	10(59)	17(90)	11(79)	30(70)	58(76)	6.8
p10 ^{CDKN2A} (Cytoplasmic)	(+)	0(0)	7(41)	5(26)	6(43)	30(70)	41(54)	4.8
	(-)	5(100)	10(59)	14(74)	8(57)	13(30)	35(46)	4.5
p10 ^{CDKN2A} (Nuclear/cytoplasmic)	(+ / +)	0(0)	3(18)	0(0)	3(21)	13(30)	16(21)	1.9
	(- / -)	3(60)	12(71)	15(79)	10(71)	24(55)	49(65)	6.1
CDKN2A	M	3(60)	5(29)	4(21)	4(29)	19(44)	27(35)	3.2
	U	5(100)	17(100)	19(100)	14(100)	43(100)	79(100)	9.3

NT – Non-tumor; M – Methylated; U – Non-methylated.

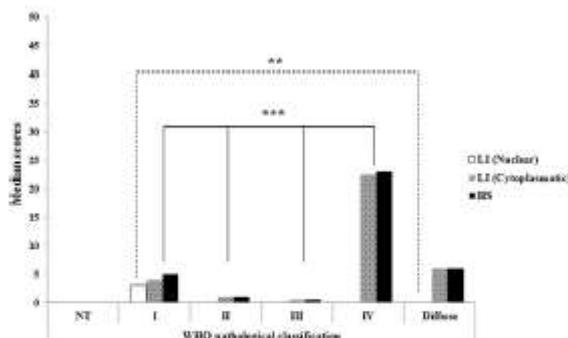


Fig. 4. Median scores attributed to tumor suppressor protein nuclear p10^{CDKN2A} (U) and cytoplasmic p10^{CDKN2A} (LI and H) immunostaining according to histological classification of the cases studied (n = 93). LI (Labeling Index); NIS (NIScore); NT (Non-tumor); (***) p < 0.01; (****) p < 0.001.

rate of methylation, or failed to find it.^{9,12,13} In our study, a high frequency of methylation in CDKN2A promoter was observed in about 70% of tumors of all grades, except for grade IV tumors, which dropped to 60%, in agreement with other studies.²¹ Methylation in the CDKN2A promoter appears to be the mechanism blocking p10^{CDKN2A} expression in astrocytomas, since a direct strong negative correlation between immunohistochemical expression and methylation was observed. These data confirm that methylation in the promoter regions appears to be the main mechanism of gene silencing, as indicated in studies by Park et al.¹¹ and Alves et al.²² and that mutation does not appear to be a common phenomenon in astrocytomas.¹²

To investigate the factors that may influence promoter methylation in astrocytomas, we next correlated clinical patient characteristics with CDKN2A expression and CDKN2A promoter methylation status. In this study, there was a striking correlation between age at diagnosis and gender and CDKN2A promoter methylation, with a predominance of methylated CDKN2A in young female patients. Few reported studies focusing on methylation in astrocytic tumors have taken into account sex and age. Yu et al.⁹ in a study of methylation in astrocytomas, did not find this relationship for CDKN2A, and besides, hypermethylation of the AR gene was found to occur frequently in females. Li et al.,²⁰ studying genes other than CDKN2A, found an association between NIS and ER methylation in older glioblastoma patients but not in younger patients, although both of these genes are more often methylated in normal elder individuals than in the younger ones. As gene

promoter methylation pattern changes with age and hormonal status,^{23–25} it seems reasonable to take into account both parameters in the analysis. Alternatively, triggering factors (genetic predisposition, carcinogen exposure) may be significantly different between the young and older group of patients with astrocytomas, and these factors may then influence the incidence of CDKN2A methylation.

In summary, CDKN2A inactivation by promoter methylation is a frequent event in astrocytomas and is related to age and sex of patients. Our data suggest important interplay between gene methylation and aging and sex in tumorigenesis, but future studies should address the functional significance of the methylation events observed in astrocytomas.

Ethical approval

The present study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Complex of the Federal University of Ceará under protocol 32/2004.

Funding

None.

Author contributions

Alves, MKS: Study design, data collections, data analysis and writing.

Faria, MHC: Study design, data collections, data analysis.

Neves Filho, EHC: Data collections.

ORIGINAL RESEARCH

M.E.S. Azeite et al. / International Journal of Surgery (2013) 549–553

553

Ferrari, AC: Data collection.
 Paolini, MIMC: Data collection.
 Moraes Filho, MD: Study design; data collection.
 Rabenholtz, SHB: Study design, data analysis and writing.

Conflict of interest
 None.

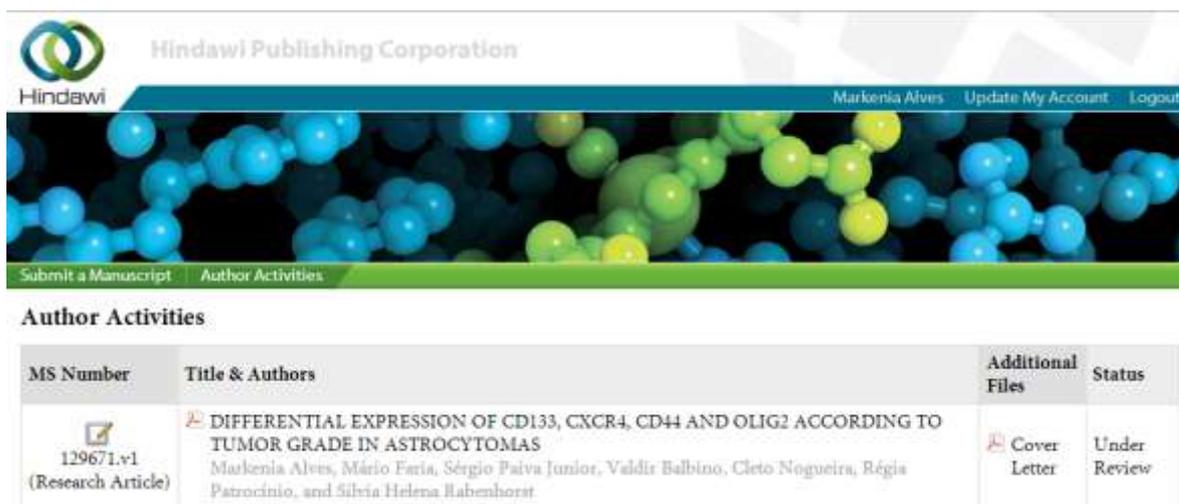
References

- Schmidt T, Mawrin C, Scherlach C, Stalke M, Fiedler B. Gliomas in adults. *Diagn. Astrocytoma* 2010;107:799–808.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97–109.
- Nakamura A, Kondo T, Ito M, Mizumoto K, Wadahyashi T, Yoshida J. Epigenetic alterations and therapeutic implications in gliomas. *Cancer Sci* 2010;101:1331–6.
- Ciacini C, Giordano A. Bland cell cycle progression. *Oncogene* 2006;25:5220–7.
- Zeilhofer M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Varrault V, et al. Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2009;361:1302–4.
- Ohgaki H, Kleihane P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 2009;100:2232–41.
- Hegi ME, Munn A, Lambiv WL, Hupp R. Brain tumors: molecular biology and targeted therapies. *Ann Oncol* 2005;17:191–7.
- Wakabayashi T, Natsuwa A, Hatake N, Fujii M, Shimizu S, Ito M, et al. p16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas. *Neurosurgery* 2009;64:455–62.
- Yu J, Zhang H, Gu J, Lin S, Li J, Lu W, et al. Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytes. *BMC Cancer* 2004;4:105.
- Zhao CH, Li TC, Shi JQ, Xia YB, Gu LM, Huang WB, et al. Relationship between inactivation of p16 gene and glioma carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:905–9.
- Park SH, Jung KC, Ro JY, Kang CH, Khang SK. CpG island methylation of p16 is associated with absence of p16 expression in glioblastomas. *J Korean Med Sci* 2000;15:555–9.
- Schmidt EE, Ichimura K, Mawrin KR, Golub RM, Collins VP. Involvement of CDKN2A(MTS1/p16) and rare mutation of both CDKN2A and CDKN2B(MTS2/p15) in primary astrocytic tumours. *Br J Cancer* 1997;75:2–8.
- Hegi ME, Hassan AQ, Sid DE, Malin G, Kleihane P. Heterozygous or homozygous deletion of the chromosome 10q24 region containing the p16^{INK4} gene is associated with amplification of the *EGFR* oncogene gene in glioblastoma. *Int J Cancer* 1997;73:57–63.
- De Souza Nascimento P, Maciel CM, Kawamura MT, Oliveira JA, Teixeira A, Carvalho Mda G, et al. Molecular analysis of CDKN2 (p16) in gliomas associated with clinical data. *Cancer Rep* 2001;8:1029–43.
- Aeffs MT, Haru S, Kapwani Y, Sugiyama K, Saito T, Mizukawa S, et al. Cytoplasmic, but not nuclear, p16 expression may signal poor prognosis in high-grade astrocytomas. *J Neurooncol* 2005;77:273–7.
- Ohgaki H, Dessen P, Sun Z, Hatanaka S, Nishikawa T, Di Pace F, et al. Genetic pathways in glioblastoma: a population based study. *Cancer Res* 2004;64:5882–9.
- Evangelou K, Braris J, Perra I, Zacharatos P, Dakou-Falada D, Katsopoulou M, et al. Electron microscopy evidence that cytoplasmic localization of the p16 (INK4) / INK4a / cyclin-dependent kinase inhibitor (CDI) in tumor cells is specific and not an artifact: A study in non-small cell lung carcinoma. *Bioch Biotechnol* 2004;79:5–10.
- Ferrari AC, Pinheiro NA, Rabenholtz SH, Calabrese OL, Rodrigues MA, de Carvalho F, et al. Methylation profile of p16 in gastric carcinoma: methylation status and microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2010;16:512–9.
- Faria MH, Gonçalves SP, Fardilha BM, Moraes-Filho MD, Rabenholtz SH. Expression of Ki-67, epidermal growth factor and c-MYC in astrocytic tumors: correlation with the histopathological grade and proliferative status. *Neuropathology* 2006;26:519–27.
- McCarty JKS, Miller LS, Cox SB, Korman J, McCarty KSt. Biomarker swapper analysis: Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal anti-epinephrine antibodies. *Arch Biochem Biophys* 1985;19:716–21.
- Zang J, Xu R, Xu JF, Qin YF, Shen XD, Yang JM, et al. p16 gene hypermethylation and hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2011;17:3043–8.
- Alexis MK, Lima VP, Bernali AC, Rodrigues MA, De Moura Campos Fardini MR, Rabenholtz SH. CDKN2A promoter methylation is related to the tumor location and histological subtype and associated with Helicobacter pylori (H+) strains in gastric adenocarcinomas. *APMIS* 2011;119:297–307.
- Fan X, Mao J, Sanjo SG, Kawamura J, PTEN, SMIT1, and p16 alterations in diffusely infiltrating astrocytomas. *Int J Oncol* 2002;21:677–74.
- Costello JF, Berger MF, Huang HY, Cavenee WK. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylated and domain condensation. *Cancer Res* 1996;56:3405–10.
- Panjo J, Gomes-Macrao C, Bernali JM, Sato Y, Zhang B, Zhang W, et al. Hypermethylation of the CpG island of p16/CDKN2 correlates with gene inactivation in gliomas. *Oncogene* 1999;18:1615–9.
- Tirabasso R, De Maggio C, Scop M, DiCicciotto G, Pizzarello S. Expression of the Polycomb-Cbx3 protein BMI1 and correlation with p16 in astrocytomas: an immunohistochemical study on 80 cases. *Pathol Res Pract* 2008;204:625–31.
- Rabenholtz S, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med (Berl)* 2004;82:55–70.
- Liang J, Zubovitz J, Perreault T, Kondosov R, Connor MK, Han K, et al. PDLIM3/ARF phosphatase 27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated C1 arrest. *Nat Med* 2002;8:1153–60.
- Watanabe T, Nakamura M, Yoshikawa Y, Kleihane P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation and homozygous deletion of the p14^{ARF} and p16^{INK4} genes in oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* 2001;101:83–9.
- Li Q, Jedlicka A, Abuja N, Gibbons MC, Bayliss D, Burger PC, et al. Concordant methylation of the *MLL* and *NEI3* genes in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 1998;16:197–202.
- Mann M, Gomez V, Villalaz JJ. Epigenetics of estrogen receptor signaling role in hormonal cancer progression and therapy. *Cancers (Basel)* 2011;3:1691–707.
- Costanzo S. Epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol* 2010;109:106–07.
- Kouzarides A, Ohnishi E, Bajic R, Kato S. Hormonal gene regulation through DNA methylation and demethylation. *Epigenomics* 2010;2:73–74.
- Calvarese V, Lanza E, Lanza A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *J Aging Res Rev* 2009;8:203–70.
- Cailla C, Horvath A. Imparting phylogeny, ontogeny, disease and possible role in present-day human evolution. *Cell Biochem Biophys* 2008;62:61–10.
- Abuja N, Lanza JF. Aging, methylation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2000;15:835–42.

ARTIGO 2:

Título: DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CD133, CXCR4, CD44 AND OLIG2 ACCORDING TO TUMOR GRADE IN ASTROCYTOMAS

- Os dados obtidos da análise da expressão de CD133, CXCR4, CD44 e OLIG2 foram associados aos dados clínicos e histopatológicos e o artigo completo foi submetido na revista *BioMed Research International*



Author Activities

MS Number	Title & Authors	Additional Files	Status
 129671.v1 (Research Article)	 DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CD133, CXCR4, CD44 AND OLIG2 ACCORDING TO TUMOR GRADE IN ASTROCYTOMAS Markenia Alves, Mário Faria, Sérgio Paiva Junior, Valdir Balbino, Cleto Nogueira, Régia Patrocínio, and Sílvia Helena Rabenhorst	 Cover Letter	Under Review

Title:

**DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CD133, CXCR4, CD44 AND OLIG2
ACCORDING TO TUMOR GRADE IN ASTROCYTOMAS**

Authors:

Markênia Kélia Santos Alves^{1*}, Mário Henrique Faria¹, Sergio de Sá Leitão Paiva Júnior², Valdir de Queiroz Balbino², Cleto Dantas Nogueira³; Régia Maria do Socorro Vidal do Patrocínio⁴; Silvia Helena Rabenhorst¹

Affiliations:

¹ Molecular Genetics Laboratory, Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

² Department of Genetics, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³ Pathologist, Department of Pathology and Forensic Medicine (UFC) and ARGUS[®] -, Fortaleza CE, Brazil,

⁴ Pathologist, Department of Pathology and Forensic Medicine (UFC) and BIOPSE[®] - Biomédica, Pesquisas e Serviços Ltda, Fortaleza CE, Brazil

Address for Correspondence:

Silvia Helena Barem Rabenhorst. Laboratório de Genética Molecular–LABGEM, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará, Rua Alexandre Baraúna s/n, Campus do Porangabussu, CEP 60.431-970 Fortaleza-CE, Brasil; Tel.: +55 (85) 3366.8639, Fax: +55 (85) 3267.3840; e-mail: srabenhorst@yahoo.com.br.

ABSTRACT

Aim: To determine if the presence of stem/progenitor cells, considering CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 expression, may define subpopulations of cells that can be used as prognostic markers. *Methods:* A series of 93 astrocytomas of different grades of malignancy were studied for expression of CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 and the data were then associated with tumor grade as well as tumor location and age. Statistical analyses were performed using the X^2 test, Spearman correlation, and k-means cluster and principal components analyses, with differences considered significant at $p < 0.05$. *Results:* OLIG2 immunostaining showed the highest frequency of positivity, followed by CXCR4, CD44 and CD133. Correlation and cluster analysis defined two population subsets according to the markers studied, a CXCR4(+)CD133(+)CD44(+) and OLIG2(+) subset. CXCR4(+), CD133(+) and CD44(+) tumors increased according to malignancy. In grade IV, this subset of tumors was significantly more frequent, also in the diffuse tumors. Moreover, tumors with CXCR4(+) and CD133(+) were preferentially located in the cerebral hemispheres and in the ventricles, mostly in patients ≥ 30 years of age. *Conclusion:* The presence of distinct stem cell subpopulations in astrocytomas could be important for tumor progression. The association with tumor location and age also corroborate these findings.

INTRODUCTION

Gliomas are the most common and the most lethal type of primary brain tumor in adults, and it remains hardly curable, leading to a constant need for research into curative strategies that may target their cell of origin [1, 2]. The classification of these tumors relies on morphological resemblance of tumor cells in the brain to normal glial cell subtypes in oligodendroglioma, astrocytoma and oligoastrocytoma [2, 3]. Among the gliomas, the astrocytomas are the most frequently found subtype and they are divided into grades of malignancy (Grade I to Grade IV) according to histopathological and clinical criteria established by the World Health Organization (WHO) [3, 4, 5]. Diffuse astrocytomas (II-IV grade) occur predominantly in adults, preferentially located in the encephalon, where glioblastomas (grade IV) are the most malignant form. They can arise without any clinical or histological evidence of a less malignant precursor lesion (primary glioblastomas), mainly in older patients, or can also progress from low-grade diffuse astrocytomas (secondary glioblastoma), in younger patients [2, 6, 7]. Unlike diffuse astrocytomas, grade I astrocytomas are considered benign and non-infiltrative tumors that predominantly affect children and young patients and are mostly located in the cerebellum [2].

The cellular origin of the astrocytomas is a controversial issue [4, 8-11]. It is hypothesized that these tumors can originate from dedifferentiation of astrocytes or from undifferentiated cells [8, 9, 12]. The present cellular heterogeneity in these tumors suggests that there is a pattern of cellular hierarchy in the same tumor as in normal tissue. According to the stem cell hypothesis, this hierarchy consists of stem-like cells, progenitor cells, and terminally differentiated cells [10, 13, 14]. Regardless of tumor origin, the presence of stem cells in these tumors is well established in the literature [4, 8, 9, 15], especially in glioblastomas [15-17]. Their presence has been related to tumor self-renewal and initiation, and their asymmetric division contributes to tumor heterogeneity [9, 10]. These cells can be distinguished in tumor tissue by modification of their gene expression, including those encoding cell surface antigens, such as CD133, CD44 and CXCR4 [15, 18, 19].

CD133 is a neural stem cell subset marker, whose function is not fully understood [18, 20-22]. There are reports showing that CD133, by binding to cell membrane cholesterol, may participate in organizing the stem cells' membrane and it may contribute to stem cell self-renewal and glioma formation [20, 22]. Additionally, it inhibits asymmetric cell division, influencing the outcome of balanced proliferation versus cell differentiation [20, 22]. Like CD133, CXCR4 is a stem cell marker, important in the development of neural stem cells, and

it acts as one of the major chemokine G protein-coupled receptors [23, 24]. Besides tumor growth stimulation and metastasis promotion, it seems to allow the maintenance and migration of stem/progenitor cells from their place of origin to their final destination [24, 25]. CD44 is a mesenchymal stem cell marker in later stages of differentiation [26-28]. It is one of the major hyaluronan receptors, also associated with tumor invasion, migration and growth. It is also important for the homing and settling of adult stem cells [28].

Parallel to the cell surface markers, OLIG2 is a helix-loop-helix (bHLH) transcription factor that responds to sonic hedgehog (Shh) basic signaling, noteworthy for directing glial cells or neuronal progenitors in the subventricular zone [29, 30]. It is involved in glial cell maturation, promoting the differentiation of oligodendrocytes and regulating astrocyte maturation [31]. Additionally, in cancer, OLIG2 has been found to be also related to the regulation of stem/progenitor cells growth [30, 31].

Despite the association of these markers with stem/progenitor cells in various CNS cancers, many of the current studies have investigated the presence of these markers individually [31-33] and those which analyzed associated presence did not assess all these markers together [15, 34]. Besides, the few studies that have related CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 to tumor progression are mostly in glioblastomas [35, 36]. Based on the importance of these markers, this study aimed to identify subpopulations of stem cells and glial progenitors in a series of astrocytomas of different grades to identify groups according to the presence of these markers, since CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 show different functions in stem cells and since they may be expressed in different stages of cell differentiation. Accordingly, these subpopulations were studied according to tumor grade and other histological parameters.

MATERIAL AND METHODS

The present study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Complex of the Federal University of Ceará under protocol no. 32/2004, according to Resolution 196/96 of the National Council of Health, Ministry of Health/Brazil. We investigated the expression of CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 proteins in 93 samples of formalin-fixed paraffin-embedded astrocytic tumors of different grades (WHO) (18 grade I, 18 grade II, 13 grade III and 44 grade IV), collected during the period of 2003 to 2012. The selection criteria were (1) the existence of sufficient material (blocks) for each case, (2) good quality of histological samples and (3) agreement of the histopathological diagnostic and grading according to WHO parameters. All the samples were sectioned at 5 μm and processed for histopathological evaluation (hematoxylin-eosin staining) and immunostaining analysis.

Immunostaining

Immunohistochemical staining (IH) was performed according to a previously described protocol [37]. Briefly, after deparaffinization and rehydration, antigen retrieval was carried out by microwave-treatment of the slides for 15 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0). Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H_2O_2 . Slides were incubated in a humid chamber overnight at 4°C with the following primary antibodies: CD133 (Clone N/A; dilution 1:50; Biocare Medical, Concord, CA, USA), CXCR4 (Clone N/A; dilution 1:100; Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), CD44 (Clone SP37; dilution 1:70; Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) and OLIG2 (Clone N/A; dilution 1:100; IBL, Gunma, Japan). The reaction was detected with the LSAB+ system (DakoCytomation®, Carpinteria, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Confirmed cases of CD133-positive human kidney, CXCR4-positive human kidney, CD44-positive human breast carcinoma and OLIG2-positive human brain specimens were used as positive controls.

Immunostaining analyses

The immunohistochemical evaluation was performed independently by two experienced technicians, using direct light microscopy. Any conflicting results were jointly considered for a consensual determination. Protein expression was quantified by manual counting of at least 1,000 tumor cells in 10 different fields at a magnification of X400. The labeling index expresses the percentage of nuclear or cytoplasmic positive cells in each tumor

sample [38]. Only cases with labeling index equal to or greater than 5% were considered positive.

Statistical analyses

Descriptive data were expressed as frequency distributions and as medians. Comparison between quantitative variables was performed by nonparametric approaches (Shapiro-Wilk test, Kruskal-Wallis H-test, Mann-Whitney U-test and Spearman's rank correlation). All statistical analyses were performed using SPSS® 14.0 (Chicago, IL, USA). A difference with $p < 0.05$ was considered statistically significant.

The between-compartment separation has been analyzed using k-means cluster analysis and principal components analysis between quantitative variables. The parameters were computed using the package "fpc" (Hennig, 2010) and the package "stats" in R (Vienna, Austria).

RESULTS

Among the 93 astrocytomas included in this study, 18 (19.4%) were classified as grade I, 18 (19.4%) as grade II, 13 (14.0%) as grade III, and 44 (47.2 %) as glioblastomas. The median age of the patients was 42.5 years (ranging 2-81 years) and 50.5% (47/93) of patients were male. It was possible to obtain the anatomic location of 54 tumors, where they were preferentially located in the cerebral hemispheres (64.8%, 35/54). Tumors located in the cerebral hemispheres and cerebellum were predominantly grades IV ($p<0.000$) and I ($p<0.000$), respectively.

CD133 immunoeexpression was observed in 45.2% (42/93), CD44 in 55.9% (52/93) and CXCR4 in 60.2% (56/93) of the cases. The majority of the cases (91.3%; 85/93) were OLIG2 positive using LI cutoff of 5%. To exclude a possible basal expression, OLIG2 (+) tumors were considered as those with $LI \geq 25\%$, and by using this cutoff, the frequency of positivity was 73.1% (68/93).

As each astrocytoma grade may have a preferential location and affect a certain age group, we stratified our cases by anatomic site and random age cutoffs to verify the influence of these parameters on CD133, CD44, CXCR4 and OLIG2 expression. Using a cutoff of 30 years, it was possible to observe that (Figure 1), besides all markers having a relevant frequency of positivity in patients age ≥ 30 years, CD133(+) tumors, as well as CXCR4(+) tumors, were significantly more frequent in these patients than in patients < 30 years old ($p= 0.03$ and $p= 0.02$, respectively). Considering the location (Figure 2), cases of CD133(+) and CXCR4(+) were more frequent in tumors located in the ventricles and cerebral hemispheres sites than in the cerebellum ($p=0.042$; $p=0.02$ and $p=0.045$; $p=0.008$, respectively), while cases of CD44(+) were more frequent in the ventricles, but only significantly when compared to cerebral hemispheres ($p=0.04$). OLIG2-positive tumors were more frequently found in the cerebellum, but without statistical significance.

Correlation between the CD133, CD44, CXCR4 and OLIG2 proteins

The correlations between the stem cell markers studied (Table 1) showed that CXCR4 was associated with CD133 and CD44, where almost all CD133(+) cases (90.5%; 38/42) were positively correlated with CXCR4 (+) ($p<0.000$; $R=+0.561$) and 69.2% (36/52) of CD44 (+) cases were CXCR4 (+) ($p=0.046$; $R=+0.207$); however, no correlation was observed between OLIG2 and the other markers.

Using principal component analysis (PCA) for the LI analysis of CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2, it was possible to observe that the first two principal components (PC1 and PC2) explained 74.22% of the variability, and that the markers CD133, CXCR4 and CD44 were associated with PC1, while OLIG2 associated with PC2 (Table 2).

Relationship between the CD133, CD44, CXCR4 and OLIG2 proteins and histological grade

The distribution of the cases positive for CD133, CD44, CXCR4 and OLIG2 according to tumor grade is shown in Figure 3. The frequency of CD133(+) and CXCR4(+) cases increased with tumor grade, with a significantly higher frequency in grade IV tumors than in grade I tumors ($p=0.013$; $p<0.000$, respectively). Additionally, for CXCR4(+), significant differences were also observed for grades II ($p=0.017$) and III ($p=0.002$) when compared to grade I. Considering the diffuse tumors, a statistically significant difference was also found compared to grade I tumors ($p=0.030$; $p<0.000$, respectively). On the other hand, CD44 showed a different pattern. This marker had higher frequency of positive cases in grade I tumors. However, considering the diffuse tumors, the frequency significantly increased according to the malignancy. Grade IV tumors showed significantly higher frequency of CD44(+) cases than did grade II and grade III ($p<0.001$; $p=0.02$, respectively). In fact, considering all the CD44-positive cases, 62% (32/52) of them were included in grade IV. Conversely, OLIG2-positive cases decreased with tumor grade, without statistical significance.

The correlation between the markers studied in each tumor grade is presented in Table 3. From this analysis, it is possible to summarize that in the grade I and II tumors, CD133-negative cases were also negative for CXCR4. On the other hand, in grade IV, there was a predominance of CD133(+) and CXCR4(+) cases. Concomitance of CD133(+), CXCR4(+) and CD44(+) was significantly associated with IV grade tumors ($p=0.008$). These same correlations were observed in the diffuse tumors; moreover, in these tumors, a predominance of CD133(+)CXCR4(+)OLIG2(+) cases was also observed. Additionally, it is interesting to note that grade I tumors that showed high frequency of CD44(+) were also OLIG2(+), where among the 10 CD44 (+) cases in grade I, 9 were OLIG2 (+).

To confirm these correlations, the transformed data from PC1 and PC2 were subjected to the k-means clustering algorithm, and the same relationships described above in the correlations assessments were observed, corroborating that CD133, CXCR4 and CD44 markers were more associated with grade IV tumors and less associated with grade I tumors.

Identificação de alterações moleculares associadas à expressão de CD133, CXCR4, CD44 e OLIG2 e ao padrão de metilação em promotor de CDKN2A em tumores astrocíticos

These markers promote a separation between these two groups (Figure 4). Nevertheless, OLIG2, which was associated with PC2 (see Table 2), was not included in this separation.

DISCUSSION

The presence of stem cells in gliomas is well reported [4, 8, 9]. Although the origin of the stem cells in cancer remains controversial, its presence has been linked to propagation, resistance to radiotherapy and recurrence of disease [8-11, 15]. Among the stem cell markers, CD133, CXCR4, CD44 are observed in the early stages of CNS cell differentiation and associated with the formation of gliomas *in vitro* [26, 27], while OLIG2 is involved in cell fate [30, 31]. Recently, overexpression OLIG2 was shown to lead to glioma formation in the injured spinal cord in rats [39]. Despite the importance of these stem cell markers in astrocytoma development, the majority of the studies are limited to glioblastomas and little evidence exists about the significance of these cells in astrocytomas of different grades [15, 17, 36]. Also, there no studies with all these markers together. Accordingly, the present study evaluated the co-expression of CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 and related it to the malignancy grade and location of these tumors.

In this series of astrocytic tumors, it was possible to identify two subpopulations of CXCR4(+) CD133(+) and CXCR4(+) CD44(+) cells. In fact, using the tool for cluster analysis, these tumors were categorized into two main components, one component expressing the CXCR4, CD133 and CD44, which also can to be justified by the correlation between them, and other only OLIG2. These results were corroborated by the *in vitro* study conducted by Liu et al. [34] with primary cultured cell lines established from glioblastoma patients, in which they found an increase in CD44 and CXCR4 mRNA expression in CD133-positive cell lines compared to CD133-negative cell lines, also for other markers.

Considering malignancy grade, CD133 expression was predominant in grade IV when compared to grade I, and besides, an increase in CD133 expression was observed according to tumor grade but without significance. On the other hand, CXCR4(+) and CD44(+) statistically increased according to the malignancy grade in diffuse tumors, pointing to these markers as prognostic factors. Many studies indicate that CD133 is frequent in glioblastomas [32, 34, 36, 40], but only Ma et al. [15], in a study with different stem cell markers, including CD133 and CXCR4, showed increased expression of CD133 according to tumor grade, but not for CXCR4, differing from our study and others [41-43]. On the other hand, a high frequency of CD44 was observed in grade I. Previously, Yoshida et al. [44] and Kuppner et al. [45] reported that CD44 expression becomes stronger in high grade glioma, consistent with our results. Others observed no significant relationship between histopathological grade and

CD44 expression [46, 47]. The reasons for these contradictory findings regarding CD44 expression and tumor grade of astrocytomas are unclear, but may be because CD44 has many splicing variants, which can be recognized by different antibodies and have different meanings.

In grade I tumors, the presence of OLIG2 and CD44 and the absence of CD133 and CXCR4 in the majority of the cases is explained by these being more differentiated tumors [2]. This result could also be confirmed when the markers were analyzed in each grade, where concomitance of CD133(+) and CXCR4(+) was inversely correlated with grade I; a low frequency of these markers was observed in grade II, increasing in grades III and IV. Also, k-means clustering analyses considering PC1 and PC2 components, showed that CD133, CXCR4 and CD44 markers (PC1) were associated with grade IV and less with grade I. The existence of these two cell populations associated with specific tumor grade point to the importance of studying these markers combined, and may help to understand the progression of these tumors. In fact, studies point to the presence of stem cells giving the tumor its malignancy character [8, 9, 12].

On the other hand, the presence of OLIG2, a marker related to cell differentiation, in pilocytic tumors explains that these are more differentiated and benign. Similarly, Otero et al. [48] reported that all astrocytic tumors (WHO grade I-IV) showed diffuse OLIG2 expression, with strong staining in pilocytic astrocytomas and glioblastomas. The OLIG2-expressing cells in pilocytic astrocytomas may be an indication that these unique astrocytomas arise from certain populations of radial glia or early progenitor cells in common with oligodendroglial lineages [49]. Consistent with these findings, studies reported the presence of markers of progenitor cells (such as O4 immunoreactive cells) and the highest numbers of A2B5 glial progenitors in pilocytic tumors [50, 51]. An expression analysis of 21 pilocytic astrocytomas showed additional evidence for the relationship of pilocytic astrocytomas to a population of radial glia or early progenitors [52].

To investigate the factors that may influence CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 expression in astrocytomas, we next correlated tumor location and patient age with expression of these markers. In this study, there was a striking correlation between age at diagnosis, tumor localization and CD133 and CXCR4 expression. It was observed that CD133 (+) and CXCR4 (+) were predominant in the cerebral hemispheres, as well as CXCR4 (+) in patients ≥ 30 years old. In fact, this age group was characterized by the appearance of glioblastoma, which are preferentially located in the cerebral hemispheres [2, 6]. Although some studies

show that stem cells are preferentially located in the subventricular zone [12, 13], its high frequency in the cerebral hemispheres may be explained by the migration of these cells to repair this tissue. Additionally, it is known that glioblastomas have distinct tumorigenic pathways, dividing them into primary and secondary, where age is a relevant factor in this distinction [6, 7]. On the basis of these data, it is possible to suggest a tumorigenic pathway in grade IV tumors, located in the cerebral hemispheres, which are characterized by positivity for CD133 and CXCR4 in patients ≥ 30 years. Moreover, the presence of OLIG2 was statistically related to the cerebellum and it showed a high frequency in pilocytic tumors. In fact, the literature shows that pilocytic tumors are predominantly observed in younger patients and located in the cerebellum [2, 4]. Few studies focusing on stem/progenitor marker expression in astrocytic tumors have taken into account tumor location and age. Studies by Alexiou et al. [53] and Yunone et al. [54] found no a correlation between patient age and the expression of CD133; however, the authors evaluated only glioblastomas and pituitary adenomas, respectively.

On the basis of these data, it is possible to suggest that normal stem cells or progenitor cells may be the main targets of mutations that could lead to a brain tumor, probably through dysregulation of self-renewal pathways [8, 9, 55]. Additionally, the astroglial tumor hypothesis, attraction of adult stem cells of the brain, could be supported by an increase in CXCR4-positive cells that are associated with the migration of stem cells. Also, the presence of CD133, CXCR4 and CD44 markers shows the importance of these proteins for tumor malignancy and could be used as markers of tumor progression and included in routine diagnostic tests, and the observation of these markers in different grades of astrocytomas is important for treatment, since the capacity for self-renewal of stem cells makes these tumors more resistant to therapy [56, 57].

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no conflict of interests.

REFERENCES

- [1] Q.T. Ostrom, H. Gittleman, P. Farah, A. Ondracek, Y. Chen, Y. Wolinsky, N.E. Stroup, C. Kruchko and J.S. Barnholtz-Sloan, “CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010”, *Neuro Oncol.*, vol. 15, pp. ii1-56, 2013.
- [2] T. Schneider, C. Mawrin, C. Scherlach, M. Skalej and R. Firsching, “Gliomas in adults”, *Dtsch Arztebl Int.*, vol.45, pp. 799-807, 2010.
- [3] D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer and P. Kleihues, “The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system”, *Acta Neuropathol.*, vol. 114, n° 2, pp. 97-109, 2007.
- [4] M.J. Riemenschneider and G. Reifenberger, “Astrocytic tumors”, *Recent Results Cancer Res.*, vol. 171, n° 3, pp. 24, 2009.
- [5] J.L. Fisher, J.A. Schwartzbaum, M. Wrensch and J.L. Wiemels, “Epidemiology of brain tumors”, *Neurol Clin.*, vol. 25, n° 4, pp. 867-90, 2007.
- [6] H. Ohgaki and P. Kleihues, “The definition of primary and secondary glioblastoma”, *Clin Cancer Res.*, vol. 19, n° 4, pp. 764-72, 2013.
- [7] F.B. Furnari, T. Fenton, R.M. Bachoo, A. Mukasa, J.M. Stommel, A. Stegh, W.C. Hahn, K.L. Ligon, D.N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R.A. DePinho and W.K. Cavenee, “Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment”, *Genes and development*, vol. 2, pp. 2683-2710, 2007.
- [8] A.S. Modrek, N.S. Bayin and D.G. Placantonakis, “Brain stem cells as the cell of origin in glioma”, *World J Stem Cells*, vol. 6, n° 1, pp. 43-52, 2014.
- [9] C.L. Yin, S.Q. Lv, X.Y. Chen and H. Guo, “The role of glioma stem cells in glioma tumorigenesis”, *Front Biosci*, vol. 19, pp. 818-24, 2014.
- [10] H. Zong, R.G. Verhaak and P. Canoll, “The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements”, *Expert Rev Mol Diagn.*, vol. 12, n° 4, pp. 383-94, 2012.
- [11] J.E. Visvader, “Cells of origin in cancer”, *Nature*, vol. 469, n° 7330, pp. 314-22, 2011.
- [12] T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke and I.L. Weissman, “Stem cells, cancer and cancer stem cells”, *Nature*, vol. 414, pp. 105-111, 2001.
- [13] A. Tárnok, H. Ulrich and J. Bocsí, “Phenotypes of stem cells from diverse origin”, *Cytometry A.*, vol. 77, n° 1, pp. 6-10, 2010.

- [14] Y. Liu and M.S. Rao, “Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them”, *Biol Cell.*, vol. 96, n° 4, pp. 279-90, 2004.
- [15] Y.H. Ma, R. Mentlein, F. Knerlich, M.L. Kruse, H.M. Mehdorn and J. Held-Feindt, “Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades”, *J Neurooncol.*, vol. 86, n° 1, pp. 31-45, 2008.
- [16] M. Gatti, A. Pattarozzi, A. Bajetto, R. Würth, A. Daga, P. Fiaschi, G. Zona, T. Florio and F. Barbieri, “Inhibition of CXCL12/CXCR4 autocrine/paracrine loop reduces viability of human glioblastoma stem-like cells affecting self-renewal activity”, *Toxicology*, vol. 314 n° 2, pp. 209-20, 2013.
- [17] C. Altaner, “Glioblastoma and stem cells”, *Neoplasma*, vol. 55, n° 5, pp. 369-74, 2008.
- [18] R.H. Dahlrot, S.K. Hermansen, S. Hansen and B.W. Kristensen, “What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas?”, *Int J Clin Exp Pathol.*, vol. 6, n° 3, pp. 334-48, 2013.
- [19] P. Dell'Albani, “Stem cell markers in gliomas”, *Neurochem Res.*, vol. 33, n° 12, pp. 2407-15, 2008.
- [20] X. Yu, Y. Lin, X. Yan, Q. Tian, L. Li and E.H. Lin “CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality?”, *Curr Colorectal Cancer Rep.*, vol. 7, n° 4, pp. 253-259, 2011.
- [21] P. Grosse-Gehling, C.A. Fargeas, C. Dittfeld, Y. Garbe, M.R. Alison, D. Corbeil and L. A. Kunz-Schughart, “CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges” *J Pathol.*, vol. 229, n° 3, pp. 355-78, 2013.
- [22] E. Irollo and G. Pirozzi, “CD133: to be or not to be, is this the real question?”, *Am J Transl Res.*, vol. 5, n° 6, pp. 563-81, 2013.
- [23] M. Terasaki, Y. Sugita, F. Arakawa, Y. Okada, K. Ohshima and M. Shigemori, “CXCL12/CXCR4 signaling in malignant brain tumors: a potential pharmacological therapeutic target”, *Brain Tumor Pathol.*, vol. 28, n° 2, pp. 89-97, 2011.
- [24] R.J. Miller, G. Banisadr and B.J. Bhattacharyya, “CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development”, *J Neuroimmunol.*, vol. 198, n° 1, pp. 31-8, 2008.
- [25] M. Kucia, R. Reza, K. Miekus, J. Wanzeck, W. Wojakowski, A. Janowska-Wieczorek, J. Ratajczak and M.Z. Ratajczak, “Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis”, *Stem Cells*, vol. 23, n° 7, pp. 879-94, 2005.

- [26] J. Behnan, P. Isakson, M. Joel, C. Cilio, I.A. Langmoen, E.O. Vik-Mo and W. Badn, “Recruited brain tumor-derived mesenchymal stem cells contribute to brain tumor progression”, *Stem Cells*, vol. 32, n° 5, pp. 1110-23, 2013.
- [27] M. Zöller, “CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?”, *Nat Rev Cancer.*, vol. 11, n° 4, pp. 254-67, 2011.
- [28] R. Marhaba, P. Klingbeil, T. Nuebel, I. Nazarenko, M.W. Buechler and M. Zoeller, “CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers”, *Curr Mol Med.*, vol. 8, n° 8, pp. 784-804, 2008.
- [29] D.H. Meijer, M.F. Kane, S. Mehta, H. Liu, E. Harrington, C.M. Taylor, C.D. Stiles and D.H. Rowitch, “Separated at birth? The functional and molecular divergence of OLIG1 and OLIG2”, *Nat Rev Neurosci.*, vol. 13, n° 12, pp. 819-31, 2012.
- [30] K.L. Ligon, S.P. Fancy, R.J. Franklin and D.H. Rowitch, “Olig gene function in CNS development and disease”, *Glia*, vol. 54, n° 1, pp. 1-10, 2006.
- [31] K. Hoang-Xuan, L. Aguirre-Cruz, K. Mokhtari, Y. Marie and M. Sanson, “OLIG-1 and 2 gene expression and oligodendroglial tumours”, *Neuropathol Appl Neurobiol.*, vol. 28, n° 2, pp. 89-94, 2002.
- [32] F. Gambelli, F. Sasdelli, I. Manini, C. Gambarana, G. Oliveri, C. Miracco and V. Sorrentino, “Identification of cancer stem cells from human glioblastomas: growth and differentiation capabilities and CD133/prominin-1 expression”, *Cell Biol Int.*, vol. 36, n° 1, pp. 29-38, 2012.
- [33] A. Do Carmo, I. Patricio, M.T. Cruz, H. Carvalheiro, C.R. Oliveira and M.C. Lopes, “CXCL12/CXCR4 promotes motility and proliferation of glioma cells”, *Cancer Biol Ther.*, vol. 9, n° 1, pp. 56-65, 2010.
- [34] G. Liu, X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I.R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K.L. Black and J.S. Yu, “Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma”, *Mol Cancer.*, vol. 5, n°67, pp. 1-12, 2006.
- [35] C. Tomuleasa, O. Soritau, D. Rus-Ciuca, H. Ioani, S. Susman, M. Petrescu, T. Timis, D. Cernea, G. Kacso, A. Irimie and I.S. Florian, “Functional and molecular characterization of glioblastoma multiforme-derived cancer stem cells”, *J Buon*, vol. 15, n° 3, pp. 583-91, 2010.
- [36] D. Stieber, A. Golebiewska, L. Evers, E. Lenkiewicz, N.H. Brons, N. Nicot, A. Oudin, S. Bougnaud, F. Hertel, R. Bjerkgvig, L. Vallar, M.T. Barrett and S.P. Niclou, “Glioblastomas are composed of genetically divergent clones with distinct tumourigenic

- potential and variable stem cell-associated phenotypes”, *Acta Neuropathol.*, vol. 127, nº 2, pp. 203-19, 2014.
- [37] S.M. Hsu, L. Raine and H. Fanger, “Use of avidin biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures”, *J Histochem Cytochem.*, vol 29, pp. 577-580, 1981.
- [38] G. Landberg and G. Roos, “Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation”, *Cell Prolif.*, vol. 26, nº 4, pp. 427-37, 1993.
- [39] H.M. Kim, D.H. Hwang, J.Y. Choi, C.H. Park, H. Suh-Kim, S.U. Kim and B.G. Kim, “Differential and cooperative actions of Olig1 and Olig2 transcription factors on immature proliferating cells after contusive spinal cord injury”, *Glia*, vol. 59, nº 7, pp. 1094-106, 2011.
- [40] M. Kase, A. Minajeva, K. Niinepuu, S. Kase, M. Vardja, T. Asser and J. Jaal, “Impact of CD133 positive stem cell proportion on survival in patients with glioblastoma multiforme”, *Radiol Oncol.*, vol. 47, nº 4, pp. 405-10, 2013.
- [41] K. Christensen, H.D. Schrøder and B.W. Kristensen, “CD133 identifies perivascular niches in grade II-IV astrocytomas”, *J Neurooncol.*, vol. 90, nº 2, pp. 157-70, 2008.
- [42] J. Stremenova, E. Krepela, V. Mares, J. Trim, V. Dbaly, J. Marek, Z. Vanickova, V. Lisa, C. Yea and A. Sedo, “Expression and enzymatic activity of dipeptidyl peptidase-IV in human astrocytic tumours are associated with tumour grade”, *Int J Oncol.*, vol 31, nº 4, pp. 785-92, 2007.
- [43] S.A. Rempel, S. Dudas, S. Ge and J.A. Gutiérrez, “Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma”, *Clin Cancer Res.*, vol. 6, nº 1, pp. 102-11, 2000.
- [44] T. Yoshida, Y. Matsuda, Z. Naito and T. Ishiwata, “CD44 in human glioma correlates with histopathological grade and cell migration”, *Pathol Int.*, vol. 62, nº 7, pp. 463-70, 2012.
- [45] M.C. Kuppner, E. Van Meir, T. Gauthier, M.F. Hamou and N. de Tribolet, “Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours”, *Int J Cancer.*, vol. 50, nº 4, pp. 572-7, 1992.
- [46] L.R. Ylagan and B. Quinn, “CD44 expression in astrocytic tumors”, *Mod Pathol.*, vol. 10, nº 12, pp. 1239-46, 1997.

- [47] S. Nagasaka, K.K. Tanabe, J.M. Bruner, H. Saya, R.E. Sawaya and R.S. Morrison, “Alternative RNA splicing of the hyaluronic acid receptor CD44 in the normal human brain and in brain tumors”, *J Neurosurg.*, vol. 82, nº 5, pp. 858-63, 1995.
- [48] J.J. Otero, D. Rowitch and S. Vandenberg, “OLIG2 is differentially expressed in pediatric astrocytic and in ependymal neoplasms”, *J Neurooncol.*, vol. 104, nº 2, pp. 423-38, 2011.
- [49] H. Takei, S.T. Yogeswaren, K.K. Wong, V. Mehta, M. Chintagumpala, R.C. Dauser, C.C. Lau and A.M. Adesina, “Expression of oligodendroglial differentiation markers in pilocytic astrocytomas identifies two clinical subsets and shows a significant correlation with proliferation index and progression free survival”, *J Neurooncol.*, vol. 86, nº 2, pp. 183-90, 2008.
- [50] Y. Chen, D.K. Miles, T. Hoang, J. Shi, E. Hurlock, S.G. Kernie and Q.R. Lu, “The basic helix-loop-helix transcription factor olig2 is critical for reactive astrocyte proliferation after cortical injury”, *J Neurosci.*, vol. 28, nº 43, pp. 10983–10989, 2008.
- [51] A. Buffo, M.R. Vosko, D. Erturk, G.F. Hamann, M. Jucker, D. Rowitch and M. Gotz, “Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair”, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 102, nº 50, pp. 18183-8, 2005.
- [52] K.K. Wong, Y.M. Chang, Y.T. Tsang, L. Perlaky, J. Su, A. Adesina, D.L. Armstrong, M. Bhattacharjee, R. Dauser, S.M. Blaney, M. Chintagumpala and C.C. Lau, “Expression analysis of juvenile pilocytic astrocytomas by oligonucleotide microarray reveals two potential subgroups”, *Cancer Res.*, vol. 65, nº 1, pp. 76–84, 2005.
- [53] G.A. Alexiou, G. Vartholomatos, A. Karamoutsios, A. Batistatou, A.P. Kyritsis and S. Voulgaris, “Circulating progenitor cells: a comparison of patients with glioblastoma or meningioma”, *Acta Neurol Belg.*, vol. 113, nº 1, pp. 7-11, 2013.
- [54] S. Yunoue, K. Arita, H. Kawano, H. Uchida, H. Tokimura and H. Hirano, “Identification of CD133+ cells in pituitary adenomas”, *Neuroendocrinology*, vol. 94, nº 4, pp. 302-12, 2011.
- [55] M.T. Stockhausen, K. Kristoffersen and H.S. Poulsen, “Notch signaling and brain tumors”, *Adv Exp Med Biol.*, vol. 727, pp. 289-304, 2012.
- [56] A.U. Ahmed, B. Auffinger and M.S. Lesniak, “Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies”, *Expert Rev Neurother.*, vol. 13, nº 5, pp. 545-55, 2013.

[57] M.A. Rojas, D. Bertholdo and M. Castillo, “Stem cells: implications in the development of brain tumors”, *Radiologia*, vol. 54, nº 3, pp. 221-30, 2012.

FIGURES AND TABLES

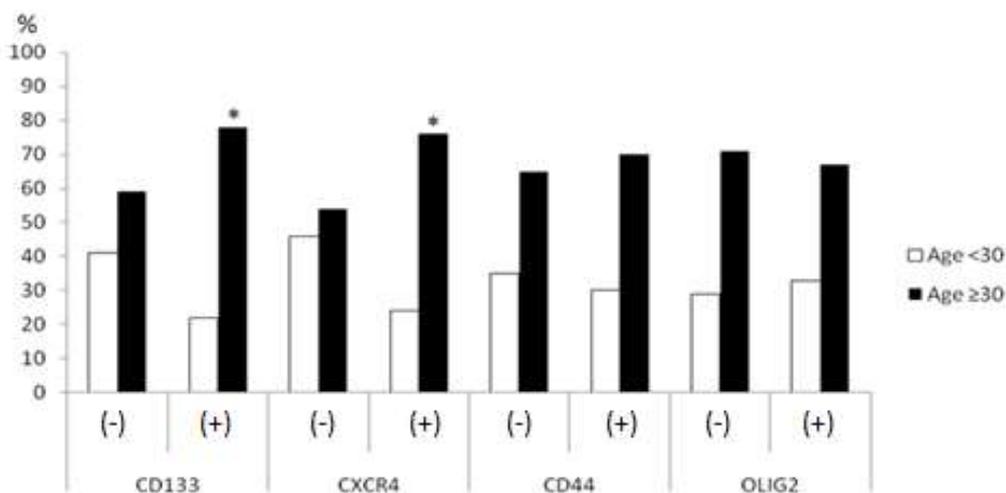


Figure 1 – Frequencies of positivity for CD133, CD44, CXCR4 and OLIG2 according to age distribution of the 93 patients studied. * $p < 0.05$.

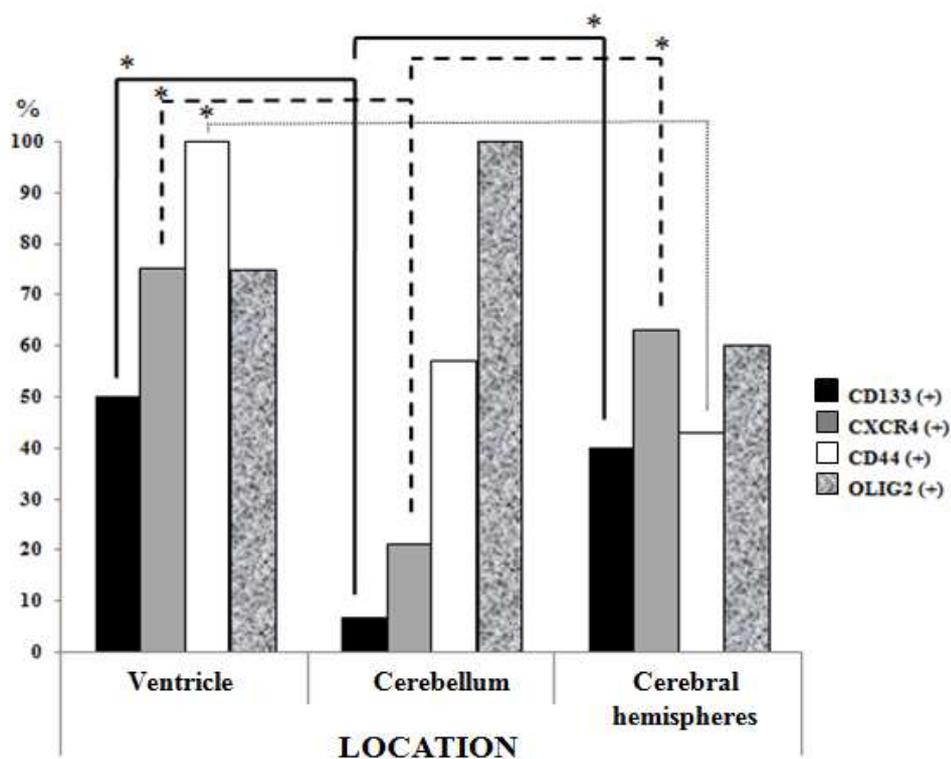


Figure 2 - Frequencies of positivity for CD133, CD44, CXCR4 and OLIG2 according to tumor location of the 93 patients studied. * $p < 0.05$.

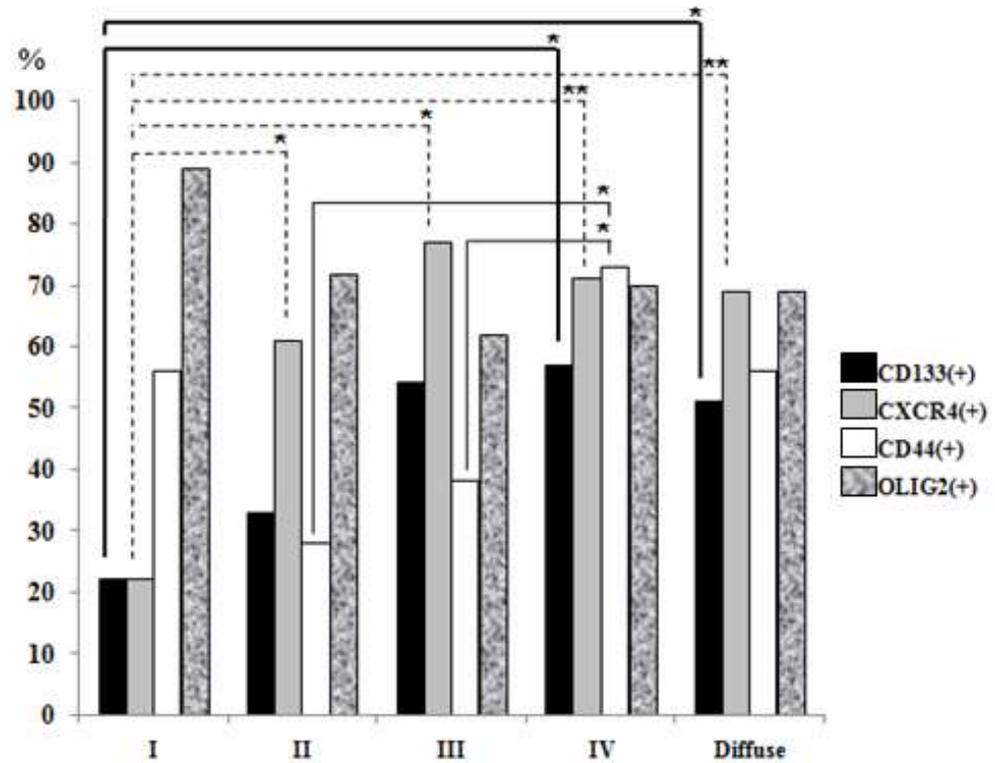


Figure 3 – Frequency of positivity of CD133, CD44, CXCR4 and OLIG2 according to histological classification of the cases studied (n=93). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

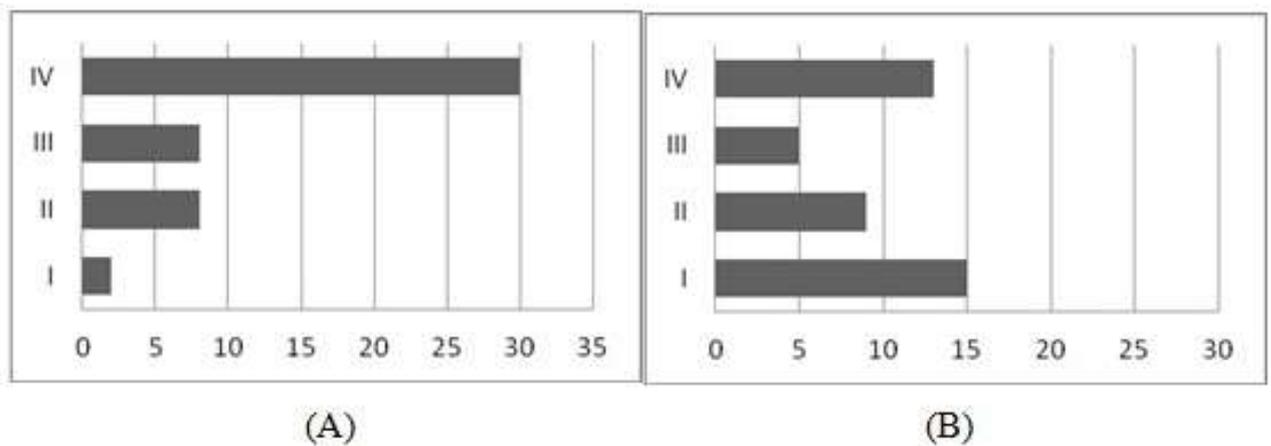


Figure 4 – Clustering data by tumor grade. In A, CD133, CXCR4 and CD44 markers, and B, OLIG2.

Identificação de alterações moleculares associadas à expressão de CD133, CXCR4, CD44 e OLIG2 e ao padrão de metilação em promotor de CDKN2A em tumores astrocíticos

Table 1 – Frequencies of positivity and correlations between proteins CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 in 93 astrocytic tumors.

		CXCR4		<i>p</i> – value R	CD44		<i>p</i> – value R	OLIG2		<i>p</i> – value R
		(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)	
CD133	(+)	38	4	0.000 +0.561	28	14	0.059 +0.197	39	12	0.427 -0.083
	(-)	18	33		24	27		29	13	
CXCR4	(+)				36	20	0.046 +0.207	43	13	0.332 +0.102
	(-)				16	21		25	12	
TOTAL		56	37	-	52	41	-	68	25	-

Table 2 - Correlation of CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 variables with two principal components (PC).

	CD133	CXCR4	CD44	OLIG2
PC1	0.77	0.84	0.702	0.185
PC2	-0.417	-0.120	0.365	0.901

Identificação de alterações moleculares associadas à expressão de CD133, CXCR4, CD44 e OLIG2 e ao padrão de metilação em promotor de CDKN2A em tumores astrocíticos

Table 3 – Correlation between markers CD133, CXCR4, CD44 and OLIG2 within each tumor grade in 93 astrocytic tumors.

		GRADE																													
		I						II						III						IV						Diffuse					
		CD133		CXCR4		CD44		CD133		CXCR4		CD44		CD133		CXCR4		CD44		CD133		CXCR4		CD44		CD133		CXCR4		CD44	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
CD133	(-)			13	1	7	7			7	5	9	3			2	4	5	1			11	8	6	13			20	17	20	17
	(+)			1	3	1	3			0	6	4	2			1	6	3	4			2	23	6	19			3	35	13	25
	<i>p-value</i>			0.002		0.405				0.015		0.729				0.459		0.159				0.000		0.586				0.000		0.086	
	<i>R</i>			+0.679		+0.209				+0.564		+0.088				+0.225		+0.415				+0.542		+0.084				+0.500		+0.200	
CXCR4	(-)					6	8			6	1					3	0			6	7					15	8				
	(+)					2	2			7	4					5	5			6	25					18	34				
	<i>p-value</i>					0.814				0.337						0.139				0.071						0.013					
	<i>R</i>					-0.060				+0.240						+0.433				+0.275						+0.284					
OLIG2	(-)	1	1	1	1	1	1	3	2	3	2	4	1	4	1	2	3	5	0	4	9	6	7	4	9	11	12	11	12	13	10
	(+)	13	3	13	3	7	9	9	4	4	9	9	4	2	6	1	7	3	5	15	16	7	24	8	23	26	26	12	40	20	32
	<i>p-value</i>	0.345		0.345		0.876		0.709		0.281		0.671		0.059		0.290		0.022		0.293		0.123		0.743		0.864		0.032		0.150	
<i>R</i>	-0.236		-0.236		+0.040		-0.088		+0.269		+0.108		+0.537		+0.318		+0.625		-0.162		+0.236		+0.051		-0.020		+0.247		+0.168		

