

**André de Macedo Bianco**

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

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

Programa de Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

**São Paulo**

**2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bianco, André de Macedo

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

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

Programa de Neurologia.

Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

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

USP/FM/DBD-222/13

## **Dedicatória**

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

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

## **Agradecimentos**

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

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

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

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

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

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

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

## NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

# SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

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

5	RESULTADOS .....	37
5.1	Caracterização demográfica.....	38
5.2	Análise da expressão gênica do <i>CXCR7</i> , <i>CXCR4</i> , <i>HIF1<math>\alpha</math></i> e <i>IDH1</i> .....	39
5.2.1	Expressão associada dos genes estudados nos astrocitomas grau II.....	44
5.2.2	Expressão associada dos genes estudados nos glioblastomas.....	46
5.2.3	Expressão relativa do <i>CXCR7</i> e <i>CXCR4</i> em relação à expressão do <i>HIF1<math>\alpha</math></i> nos astrocitomas difusamente infiltrativos.....	48
5.2.4	Expressão relativa do <i>CXCR7</i> , <i>CXCR4</i> e <i>HIF1<math>\alpha</math></i> em relação ao status de mutação de <i>IDH1</i> .....	49
5.3	Expressão proteica do <i>CXCR7</i> .....	53
5.4	Imunofluorescência.....	55
5.5	Análise da expressão gênica do <i>CXCR7</i> e sobrevida geral dos pacientes com GBM .....	56
5.6	Análise da expressão gênica do <i>CXCR4</i> e sobrevida geral dos pacientes com GBM .....	57
5.7	Análise da expressão gênica combinada do <i>CXCR7/CXCR4</i> e sobrevida geral dos pacientes com GBM .....	58
6	DISCUSSÃO .....	59
6.1	Expressões relativas de <i>CXCR7</i> e <i>CXCR4</i> aumentam com o grau de malignidade nos astrocitomas difusamente infiltrativos .....	60
6.2	A expressão proteica de <i>CXCR7</i> nas células endoteliais, assim como nas células tumorais, foi crescente com o incremento da malignidade em astrocitomas .....	62
6.3	As expressões de <i>CXCR4/CXCR7</i> se associam à expressão de <i>HIF1<math>\alpha</math></i> particularmente em GBM .....	64
6.4	A presença de mutação no <i>IDH1</i> associa-se a uma menor expressão de <i>CXCR7</i> e <i>CXCR4</i> .....	64
7	CONCLUSÕES .....	67
8	ANEXOS .....	69
9	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICES	

## LISTA DE ABREVIATURAS

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



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

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Quimiocinas e metástase. Células tumorais expressam receptores de quimiocinas.....	3
<b>Figura 2.</b> Estrutura das quimiocinas.....	10
<b>Figura 3.</b> Diagrama representando o sistema de quimiocinas, receptores transmembranares e seus ligantes.....	12
<b>Figura 4.</b> Quimiocinas angiogênicas e angiostáticas e seus receptores nas células endoteliais de seres humanos.....	13
<b>Figura 5.</b> Receptor transmembrana acoplado à proteína G.....	14
<b>Figura 6.</b> Via CXCL12.....	15
<b>Figura 7.</b> Quimiocinas e seus receptores no microambiente tumoral.....	16
<b>Figura 8.</b> Esquema representando o aumento do CXCR4 em GBM.....	18
<b>Figura 9.</b> Níveis de expressão do RNAm de <i>CXCR7</i> analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR.....	40
<b>Figura 10.</b> Níveis de expressão do RNAm de <i>CXCR4</i> analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR.....	41
<b>Figura 11.</b> Níveis de expressão do RNAm de <i>IDH1</i> analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR.....	42
<b>Figura 12.</b> Níveis de expressão do RNAm de <i>HIF1<math>\alpha</math></i> analisados em tecido não neoplásico (NN) e tumoral (AGII, AGIII e GBM) por qRT-PCR.....	43
<b>Figura 13.</b> Correlação da expressão associada nos AGII.....	45
<b>Figura 14.</b> Correlação da expressão associada nos GBM.....	47
<b>Figura 15.</b> Expressão relativa mediana do <i>CXCR7</i> e <i>CXCR4</i> em relação expressão <i>HIF1<math>\alpha</math></i> : (-) hipoexpresso e (+) hiperexpresso ( $p = 0,001$ ).....	48
<b>Figura 16.</b> Níveis de expressão RNAm <i>CXCR7</i> em relação ao status de mutação do <i>IDH1</i> .....	49

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

