UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

RICARDO PUTTINI

Identificação de Biomarcadores Diagnósticos do Glioblastoma Multiforme

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Coorientadora: Profa. Dra. Estela de Oliveira Lima

Botucatu
2020

RICARDO PUTTINI

Identificação de Biomarcadores Diagnósticos do Glioblastoma Multiforme

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Adriana Camargo Ferrasi

Coorientador(a):Prof(a).Dr(a). Estela de Oliveira Lima

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Puttini, Ricardo.
Identificação de biomarcadores diagnósticos do glioblastoma multiforme / Ricardo Puttini. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Adriana Camargo Ferrasi
Coorientador: Estela de Oliveira Lima
Capes: 90194000

1. Marcadores bioquímicos. 2. Sistema nervoso central Câncer. 3. Glioblastoma multiforme. 4. Metabolômica.

Palavras-chave: Câncer; Glioblastoma multiforme; Marcadores bioquímicos; Metabolômica; Sistema nervoso central.

Agradecimentos

Primeira e principalmente agradeço a Deus, por todas as bençãos me ele tem me concedido, desde o dom da vida até a realização deste sonho, sempre me sustentando nos momentos de fraqueza; sem Ele, nada disso seria possível.

Agradeço a minha esposa Viviana, que sempre me apoiou na realização deste mestrado, me incentivando e colaborando nos momentos de dificuldades.

Ao meu filho Luca, que mesmo nos momentos de cansaço, sempre me animava e me trazia novamente um sorriso nos lábios e animo para prosseguir, com seu jeitinho carinhoso de demonstrar amor.

Aos meus pais Renato e Rosalina, que sempre fizeram o possível e o impossível para me propiciar condições de estudar e me mostrar a importância dos estudos na vida de uma pessoa. Me deram caráter para seguir na caminhada de cientista, mesmo com tantas dificuldades que encontramos nesta carreira.

À memória de meu padrinho e tio Pedro Bueno, que sempre foi um exemplo de ser humano para mim e que de certa forma me inspirou na realização deste trabalho, pois partiu deste mundo acometido de GBM, o objeto de estudo deste trabalho. Isso me impulsionou a buscar uma forma de poder ajudar as pessoas que infelizmente vierem a ter o mesmo diagnóstico dele.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina, pelo acolhimento e pelas pessoas que apoiaram direta ou indiretamente no decorrer da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino e o pessoal do Laboratório Inovare De Biomarcadores, da F.C.M.-UNICAMP, pelo apoio e parceria na

realização das análises de espectrometria de massas, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Estela de Oliveira Lima, pela coorientação, explicações sobre o emprego da metodologia utilizada neste trabalho e apoio tecnológico nas ferramentas utilizadas para a elucidação dos biomarcadores selecionados por nós.

E em especial à Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi, primeiramente pela primazia em sua orientação, além de todo o apoio nos momentos de dificuldade do trabalho; pela compreensão em orientar-me, mesmo sabendo do escasso tempo que teria por conta de meu trabalho como professor; pelas horas de vídeo conferência, muitas das vezes tarde da noite, durante a análise dos resultados, sempre sendo acolhedora e amiga.

Ao colégio Embraer - Casimiro Montenegro Filho, na pessoa do Diretor Renato Augusto da Silva, que me deram apoio e disponibilidade de horário para a realização deste trabalho.

E a todas as pessoas, que de alguma forma, contribuíram em minha vida pessoal e/ou profissional, para a realização deste trabalho e me apoiaram durante estes dois anos de Mestrado.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

Índice

Resumo **08**

Abstract **09**

Introdução **10**

Glioblastoma Multiforme **10**

Biomarcadores **14**

Metabolômica **17**

Objetivos **20**

Gerais **20**

Específicos **20**

Materiais e Métodos **21**

Casuística **21**

Coleta **21**

Preparo da Amostra **21**

Análise por Espectrometria de Massas de Alta Resolução **22**

Análise Estatística **23**

Resultados e Discussão **24**

Caracterização da casuística **24**

Perfil Metabolômico **25**

Caracterização dos Metabólitos e Análise do Potencial para Biomarcador **32**

5-hidroximetiluracil **33**

Ácido pirúvico **36**

Arginil-Prolina **38**

3-oxodecanoil-CoA **40**

3-O-Sulfogalactosilceramida **41**

N-acilfosfatidiletanolamina **43**

PS (18:4) / (20:5) **46**

O-benzil-L-tirosina **48**

Combinação de Metabólitos **49**

Considerações Finais **50**

Conclusão **51**

Aplicabilidade na prática profissional do produto gerado pela pesquisa 52
Referências 53

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos tumores astrocíticos 11
Tabela 2 - Dados clínicos e epidemiológicos da casuística analisada.... 25
Tabela 3 - Resultado da pesquisa das massas diferencialmente abundantes no grupo glioblastoma na plataforma METLIN.. 30
Tabela 4 - Metabólitos plasmáticos que diferenciam os pacientes acometidos por Glioblastoma Multiforme (GBM)..... 31

Resumo

O Glioblastoma Multiforme (GBM) é considerado um dos mais graves e letais tipos de câncer do Sistema Nervoso Central (SNC), devido a sua alta taxa de invasão e rápida proliferação, o que o torna também de difícil cura por ressecção cirúrgica. Algumas moléculas que apresentam seu padrão de produção e secreção alterados em processos tumorais, têm se mostrado promissoras para uso como biomarcadores metabólitos da doença, podendo ser utilizados para auxiliar no diagnóstico precoce, avaliação e predição de resposta terapêutica, assim como na identificação de recidivas da doença; sendo elas identificadas em fluidos corporais, como o plasma sanguíneo, através de técnicas baseadas em espectrometria associadas a quimiometria, como no caso da Metabolômica. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo principal, identificar possíveis biomarcadores de GBM, comparando o perfil de metabólitos do plasma sanguíneo de pacientes acometidos pela doença e doadores saudáveis. Através do uso da técnica de Espectrometria de Massa (MS) em conjunto com a Metabolômica, foi possível identificar um perfil metabólico diferencial nos pacientes, permitindo individualizá-los do grupo de voluntários saudáveis, somente pela análise do plasma. Foram selecionados oito metabólitos com alto potencial para utilização como biomarcadores e em seguida tais moléculas foram devidamente identificadas e caracterizadas e seguirão para a próxima etapa na linha de pesquisa do grupo: a validação em casuística mais ampla e estudos para escolha da melhor forma de detecção laboratorial. Ainda, os resultados globais sobre as vias biológicas encontradas alteradas em glioblastoma serão publicados em revista científica de relevante impacto científico e, preferencialmente, de acesso aberto. Finalmente, o estudo poderá auxiliar no desenvolvimento de um teste diagnóstico menos invasivo, bem como disponibilizar informações inéditas a respeito da biologia da doença pode contribuir, de maneira efetiva, para melhorar o prognóstico da doença, tanto pela possibilidade de diagnosticar precocemente quanto por indicar novos potenciais alvos terapêuticos.

Palavras-chave: biomarcadores, câncer, glioblastoma multiforme, metabolômica, SNC

Abstract

Glioblastoma Multiforme (GBM) is considered one of the most severe and lethal types of cancer of the Central Nervous System (CNS) due to its high rate of invasion and rapid proliferation, which also makes it difficult to cure by surgical resection. Some molecules that have their production and secretion pattern altered in tumor processes have shown promise for use as metabolite biomarkers of the disease, and can be used to assist in early diagnosis, assessment and prediction of therapeutic response, and the identification of disease recurrences; they are identified in body fluids, such as blood plasma, using techniques based on spectrometry associated with chemometry, as in the case of Metabolomics. In this context, this study aimed to identify possible GBM biomarkers, comparing the profile of blood plasma metabolites of patients affected by the disease and healthy donors. Through the use of the Mass Spectrometry (MS) technique in conjunction with Metabolomics, it was possible to identify a differential metabolic profile in patients, allowing them to be distinguished from the group of healthy volunteers, just by analyzing the plasma. Eight metabolites with high potential for use as biomarkers were selected. Such molecules have been adequately identified and characterized and will proceed to the next stage in the group's: line of research validation in a broader series and studies to choose the best form of laboratory detection. Furthermore, the global results on the biological pathways found altered in glioblastoma will be published in a scientific journal of relevant scientific impact and preferably, open access Finally, the study may assist in the development of a less invasive diagnostic test and providing new information about the biology of the disease can effectively contribute to improving the prognosis of the disease, both by the possibility of early diagnosis and by indicating new potential therapeutic targets

Keywords: biomarkers, cancer, glioblastoma multiforme, metabolomics, CNS

Introdução

Glioblastoma Multiforme

O câncer é um problema de saúde pública e aparece entre as quatro principais causas de morte antes dos 70 anos de idade, na maioria dos países. Dados mundiais de 2018 mostram que o câncer foi responsável por mais de 9,6 milhões de óbitos para ambos os sexos em todas as idades (1). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) prevê para o ano de 2020, cerca de 626 mil novos casos de câncer no território nacional. Deste total, estima-se que cerca de 11,1 mil novos casos serão de câncer do Sistema Nervoso Central (SNC) (2), atingindo taxas de mortalidade superiores a 80% (2).

Estes dados revelam a gravidade deste tipo de câncer, que normalmente é detectado tardiamente, o que prejudica muito seu tratamento e diminui as chances de sobrevida dos pacientes diagnosticados com esta classe de tumor.

É importante ressaltar que os tumores do SNC são classificados baseando-se no tipo histológico do tumor primário e o grau de malignidade. Os gliomas são neoplasias originárias das células da glia encefálica, cuja principal função é dar suporte nutricional, sanguíneo, estrutural e de defesa aos neurônios. Eles podem ser divididos em quatro grandes grupos, segundo o tipo celular que os originou: astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e os oligoastrocitomas (gliomas mistos). Dentre os gliomas, 70% são astrocitomas, 10-15 % são oligodendrogliomas e 3-5 % são do tipo ependimomas (3).

Ademais, os tumores astrocíticos são derivados das principais células de sustentação da glia, os astrócitos, e são divididos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (4) em quatro categorias, conforme descrito na Tabela 1:

Tabela 1 **– Classificação dos tumores astrocíticos**

Grau I	benignos, baixo grau, ótimo prognóstico após excisão cirúrgica, comum na infância; incluem o Astrocitoma Pilocítico Juvenil, o Astrocitoma subependimário de células gigantes e o xantoastrocitoma pleomorfo
Grau II	baixo grau, com potencial de recorrência como tumores de alto grau, e que podem ser malignos ou benignos
Grau III	malignos e com alto potencial de recorrência como tumores de alto grau; também denominados astrocitoma anaplásico
Grau IV	alto grau, malignos e agressivos, alta taxa de mitose; comumente chamados Glioblastoma Multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM), objeto do presente estudo, é o tipo de tumor cerebral mais frequente em adultos e corresponde a aproximadamente 50% dos tumores malignos do SNC (5). Acomete principalmente adultos, em sua maioria após a quinta década da vida, sendo 1,58 vezes mais prevalente em homens (6).

Esse tipo de tumor tem origem astrocitária, sendo caracterizado por indiferenciação celular, rápido crescimento infiltrativo, proliferação microvascular e por apresentar necrose. A necrose o diferencia histologicamente dos gliomas de baixo grau (4) e reduz drasticamente a taxa média de sobrevida dos pacientes (7). Surgem como uma lesão única, normalmente localizada no lobo frontal (maioria dos casos) ou no lobo temporal (segundo maior número de casos). Não possuem grande potencial metastático, apesar de serem altamente infiltrativos e possuírem grande agressividade pontual. São clinicamente agressivos e extremamente infiltrativos, com capacidade de invasão extra-axial (8 e 9).

Paralelamente, os sintomas variam de leves a intensos, dependendo da localização no cérebro e tamanho do tumor e, alguns dos mais comuns incluem cefaleia, náuseas e déficit neurológico progressivo (8), caracterizando

uma apresentação clínica não muito específica. E nesse cenário, quando o paciente chega a receber um diagnóstico, a lesão tumoral já danificou o tecido saudável ao seu redor.

Não há evidências científicas de que o GBM seja hereditário, contudo, algumas síndromes de câncer hereditário estão associadas ao aumento da ocorrência de glioblastoma na infância e na adolescência, por exemplo, neurofibromatose tipo-1, síndrome de Li-Fraumeni e síndrome de Turcot (9).

Embora apresente-se notavelmente heterogêneo no que diz respeito às alterações genéticas, em 2016, a atualização da Classificação da OMS dos Tumores do SNC apresentou marcadores para classificação molecular relevantes para a prática clínica e eficientes em discriminar os GBM primários, que se originam a partir de células morfologicamente normais, dos GBM secundários, que são originários da evolução dos astrocitomas de baixo grau (I e II) preexistentes (4). GBM primários são comumente caracterizados pela ausência de mutações nos genes IDH1 (*Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+) 1*) e IDH2 (*Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+) 2),* presença de mutações na região promotora do gene TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*), deleção em homozigose dos genes CDKN2A/CDKN2B (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/2B*), deleção cromossômica 10p e 10q, alterações em EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), mutações em PTEN (*Phosphatase And Tensin Homolog*) e mutações em TP53 (*Tumor Protein P53*) e PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*). GBM secundários mostram mutações nos genes IDH1 ou IDH2 e, com frequência, nos genes TP53 (*Tumor Protein P53*) e ATRX (*ATRX Chromatin Remodeler*), deleção cromossômica 10q e ausência de amplificação de EGFR (4).

Em virtude do prognóstico ruim que acompanha os pacientes acometidos por glioblastoma é evidente a importância em diagnosticá-los o mais precocemente possível.

Frequentemente, tem-se explorado as técnicas baseadas em imagem, como a Tomografia Axial Computadorizada Crâneo-Encefálica (TAC-CE) e Ressonância Magnética Nuclear Crâneo-Encefálica (RMN-CE) para a

detecção do tumor, buscando por um diagnóstico mais precoce e melhora da sobrevida, contudo, a confirmação diagnóstica somente ocorrerá após biópsia e análise histológica, um método bastante invasivo.

Sobretudo, os limitantes mais comumente observados com o uso das análises radiológicas como TAC-CE no diagnóstico do GBM é o fato deste ser confundido com outros tumores ou mesmo processos não neoplásicos, como abcessos bacterianos, carcinomas metastáticos, infarte cerebral, linfomas primários e meningiomas atípicos (10). Nas imagens por RMN-CE, é possível a evidenciação de componentes quísticos ou hipodensidades, que podem sugerir a presença de hemorragia intratumoral, calcificação ou componentes mucinosos; confundindo o diagnóstico de GBM.

Com base nos limitantes ligados ao diagnóstico por TAC-CE e RMN-CE, a análise histológica após a biópsia continua sendo o *padrão ouro* para o diagnóstico definitivo de GBM.

Atualmente, o tratamento baseia-se ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia adjuvante (11). A **cirurgia** é a primeira e principal etapa do tratamento. Tem como função alcançar o maior grau de ressecção tumoral possível. Ressecções iguais ou superiores a 98% do tumor (*gross-total ressection*) proporcionam os melhores prognósticos de sobrevida. Porém, mesmo com a ressecção de todo o tumor visível, uma grande quantidade de células tumorais permanece no cérebro, devido às altas taxas de microinvasão; a **radioterapia** representa o principal tratamento adjuvante e geralmente é indicada a radioterapia conformacional direcionada para a área da lesão; na **quimioterapia adjuvante,** a ação é limitada, pois a barreira hemato-encefálica dificulta a penetração de quimioterápicos no cérebro, reduzindo os seus efeitos. A temozolamida (temodal), é o quimioterápico mais utilizado neste tratamento, capaz de sensibilizar as células tumorais para a radioterapia, melhorando a sua eficácia.

Salienta-se, ainda, que a sobrevida média se mantém entre 10 a 15 meses, mesmo após ressecção cirúrgica, seguida de quimioterapia e posterior

radioterapia. Sendo que a taxa de pacientes que apresentam sobrevida de 5 anos após o diagnóstico, não chega a 4% (12).

Por outro lado, pacientes com histórico anterior de tumores cerebrais de baixo grau que evoluíram para GBM (GBM secundário) apresentam um melhor prognóstico quando comparados com os pacientes que apresentam logo no início da malignidade, tumores de Grau IV (GBM primário). (13)

A saber, a resposta ao tratamento adjuvante com temozolamida (TMZ), um agente alquilante, foi associada a ocorrência de silenciamento transcricional através de metilação na região promotora do gene O^6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) (14 e 15). A enzima MGMT atua no reparo de erros do DNA, específica para correção da incorporação de radicais alquil (CH_3) da posição O^6 da base guanina. Assim, o silenciamento de MGMT impediria que os erros no DNA (alquilação) provocados pelo quimioterápico (TMZ) fossem corrigidos, aumentando a eficácia da quimioterapia (16). Minniti et al (17), em um estudo com 83 pacientes com mais de 70 anos e acometidos de GBM, observaram um aumento de cerca de 50% na sobrevida dos pacientes com metilação em MGMT na células tumorais, ampliando de 10,3 meses de sobrevida (MGMT sem a metilação) para 15,3 meses (com MGMT metilado).

Em virtude da agressividade do tumor, a sua localização em um tecido nobre do organismo, os sintomas inespecíficos e as limitações no diagnóstico, combinados à resposta pobre ao tratamento é necessário priorizar a busca por um biomarcador de diagnóstico precoce, bem como a produção de conhecimentos sobre os mecanismos biológicos envolvidos na doença.

Biomarcadores

Os biomarcadores são substâncias liberadas tanto por células sadias quanto pelas células tumorais, que podem ser medidas quantitativamente, por métodos bioquímicos, imunológicos, morfométricos, ultra-estruturais, moleculares e espectrométricos em fluídos ou em tecidos corporais, que

possivelmente estejam associados a neoplasias, podendo até indicar o possível órgão acometido pela neoplasia em questão (18).

Nos últimos anos foram identificadas diversas moléculas (proteínas, peptídeos, microRNAs, etc.) que são produzidas e secretadas em diferentes tipos de neoplasias, conferindo a estas a possibilidade de serem utilizadas como biomarcadores tumorais para auxiliar no diagnóstico, avaliar e prever a resposta terapêutica e identificar recidivas da doença (19). Dentre essas moléculas estão:

- **Alfafetoproteína (AFP):** glicoproteína normalmente presente no soro fetal. Nos adultos, os níveis normais estão entre 5ng/mL e 15ng/mL, e níveis acima de 500ng/mL são indicativos de malignidade. Quando este valor está acima de 1000ng/mL há indicativos da presença de neoplasia (20, 21 e 22); Encontrada em 70% dos pacientes com tumores testiculares não seminomatosos (23) e também utilizada como biomarcador no diagnóstico de pacientes com carcinoma hepatocelular (24 e 25).
- **Antígeno Mucóide Associado ao Carcinoma (MCA):** glicoproteína que pode ser utilizada para o monitoramento de carcinomas mamários. Em condições fisiológicas normais, sua concentração é 11U/mL. (21). Contudo, em doenças benignas de mama, tumores de ovário, de colo uterino, endométrio e próstata, este marcador também pode ser encontrado em concentrações mais elevadas do que o normal (21).
- **Cromogranina A (Secretogranina I):** glicoproteína encontrada em tecidos neuroendócrinos; é utilizada como marcador tumoral para neoplasias endócrinas, tais como: síndrome carcinóide, feocromocitoma, carcinoma de células ilhotas do pâncreas, carcinoma pulmonar de células pequenas, adenoma hipofisário, carcinoma medular da tireóide e neoplasia endócrina múltipla. Em condições normais, a concentração sérica é de 10ng/mL a 50ng/mL (21).
- **Antígeno Tumoral da Bexiga (BTA)**: glicoproteína expressa por poucas células normais e por várias células tumorais. Pacientes

acometidos por tumores uroteliais da bexiga, liberam esta proteína na urina. Contudo, casos de urolitíase, processos irritativos da bexiga ou sonda vesical de demora, podem apresentar falso positivo na análise deste marcador (26).

- **CEA (Antígeno Carcinoembrionário):** glicoproteína sintetizada por células embrionárias. Sua concentração é elevada durante a embriogênese e diminui à medida que as células vão se especializando. Algumas células tumorais aumentam a sua síntese, como por exemplo no carcinoma colorretal, câncer de mama, pulmão, estômago, útero, entre outras. Os fumantes também podem apresentar aumento do CEA, assim como outras condições não malignas tais como inflamações, infecções, cirrose hepática, enfisema pulmonar e doença mamária benigna.

Concomitantemente, os biomarcadores podem ser divididos em: **Marcadores Intermediários**, que medem alterações celulares e moleculares antes que a malignidade tenha se manifestado; e **Marcadores Diagnósticos**, que aparecem simultaneamente com a malignidade.

Para validar o uso clínico de um biomarcador tumoral, algumas etapas podem ser seguidas (27):

- Primeira etapa: identificação dos marcadores biológicos presentes em linhagens de células tumorais;
- Segunda etapa: teste dos marcadores, em tecidos provenientes de biópsia ou plasma sanguíneo de pacientes acometidos pelo tumor;
- Terceira etapa: comparação com tecidos normais e com processo inflamatório.
- Quarta etapa: teste em pacientes com suspeita do tipo de câncer analisado, para validação como teste não invasivo, que possa ser utilizado em substituição ou em conjunto com testes “padrão ouro” para o diagnóstico da doença.

Paralelamente, estudos têm evidenciado a heterogeneidade molecular dos GBM (28, 29 e 30), indicando a provável inexistência de marcadores únicos para o diagnóstico ou indicadores de prognóstico. Assim, análises moleculares mais extensas, como a transcriptômica e metabolômica se fazem necessárias para uma compreensão global das vias envolvidas e a identificação de padrões de expressão indicadoras de prognóstico ou diagnóstico.

Metabolômica

Nesse contexto, as "ciências ômicas" têm sido utilizadas para a identificação de biomarcadores. Seu principal objetivo é analisar e compreender o funcionamento celular e as alterações moleculares ocorridas durante o processo patológico. As técnicas aplicadas a esse tipo de análises permitem abordar o estudo de genomas, de transcriptomas, de proteomas e de metabolomas.

A metabolômica tem demonstrado uma grande utilidade na busca por biomarcadores, onde os produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica são analisados, com o enfoque principal em determinar o conjunto de todos os metabólitos com baixa massa molecular (até 1500 Da), presentes em um sistema biológico (31).

Nicholson et al (32) definiram a metabolômica (do inglês, *metabonomics*), como sendo *uma medida quantitativa da resposta metabólica de um sistema biológico após estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas*. Posteriormente, Oliver Fiehn (33), introduziu o termo metabolômica, como sendo *a análise abrangente e quantitativa do metaboloma de um sistema biológico.*

De certo, a análise metabolômica do plasma sanguíneo de pacientes acometidos por GBM pode evidenciar os possíveis metabólitos diferencialmente abundantes quando comparados a indivíduos saudáveis, sendo assim, possibilita identificar potenciais biomarcadores para o

diagnóstico em fases precoces, dispensando a necessidade de procedimentos invasivos e arriscados para confirmação diagnóstica. Assim, seria necessário apenas uma amostra de sangue; reduzindo os riscos ao paciente e diminuindo os custos, pois, além de dispensar o uso de salas cirúrgicas, evitaria o deslocamento de uma grande equipe técnica para a realização do procedimento de coleta e análise do material da biópsia.

Vários estudos de Metabolômica vêm sendo realizados para identificar possíveis biomarcadores que estejam relacionados à presença de diversos tipos de tumores.

Huang et al (34) identificaram a presença de 105 metabólitos, presentes nos tecidos tumorais, adjacentes e distais, de portadores de carcinoma hepatocelular (CHC), usando a metabolômica aplicada à resultados de análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Isto levou a determinação de um possível perfil de metabólitos presentes em pacientes com CHC, onde estavam inclusos o aumento da glicólise, gliconeogênese e β-oxidação com ciclo reduzido do ácido tricarboxílico e Δ-12 dessaturase. Foi possível também identificar um aumento nos níveis de glutationa e outras moléculas antioxidantes, além de uma redução nos níveis de ácidos graxos poliinsaturados, que estariam associados à presença de inflamação e fosfolipase A2.

Similarmente, estudos metabolômicos utilizando dados de espectros de RMN do soro sanguíneo de pacientes com câncer de pulmão (35), demonstraram a possibilidade de estadiamento do câncer para diferenciar os pacientes em estágio inicial (I e II) de pacientes em estágio avançado (III e IV). Dos metabólitos identificados, os candidatos a biomarcadores de estadiamento foram os que apresentaram mudanças em relação à progressão do câncer em todos os quatro estágios. Foram separados seis metabólitos, com potencial de biomarcadores de estadiamento tumorais para o câncer de pulmão, onde verificou-se que durante sua progressão, os níveis de isoleucina e acetoacetato estavam diminuindo, enquanto os níveis de creatina, glicoproteínas 1 N- acetiladas (NAC1), glicoproteínas 2 N- acetiladas (NAC2)

e glicerol estavam aumentando. Isto possibilitou a definição de possíveis padrões metabólicos de progressão do câncer de pulmão, separando-os em seus quatro estágios.

Estudos metabolômicos baseados em Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) do soro de 41 pacientes com CHC e 38 pessoas saudáveis, identificaram a 1-metiladenosina sérica como um biomarcador associado especificamente aos pacientes portadores do câncer, além de detectarem sensibilidade significativamente melhorada quando havia uma combinação entre a 1-metiladenosina e a α-fetoproteína (AFP) (36).

De acordo com um estudo com tumores do SNC, realizado por Locasale et al. (37), foi analisado, por metabolômica (LC-MS), o líquido cefalorraquidiano de pacientes com tumores cerebrais e indivíduos sadios, e foram encontrados 39 metabólitos diferenciais nos pacientes em relação aos controles.

Tais estudos têm reforçado o grande potencial do uso da técnica para a identificação de biomarcadores diagnósticos de vários tipos de tumores.

Através da metabolômica, tornou-se possível a observação de desregulação metabólica em pacientes acometidos por câncer e estes dados estão sendo utilizados para a detecção de tumores. Descobriu-se que níveis anormais de vários metabólitos, relacionados ao papel causador de alterações no papel de enzimas relacionadas a tumorigênese, desempenham papel direto no desenvolvimento do câncer. Estas alterações em metabólitos podem ser utilizadas como biomarcadores para diagnóstico e prognóstico, assim como podem ser potenciais alvos para terapias do câncer (38).

Baseado neste cenário, justifica-se a necessidade de desenvolvimento de técnicas menos invasivas e mais acuradas, para a detecção de GBM de forma mais precoce, assim como para o controle da doença e análise de possíveis recidivas em pacientes que passaram por tratamento, onde a espectrometria de massa em associação com a metabolômica, traz um contexto bastante promissor para a melhoria de condições de identificação e tratamento dos pacientes acometidos por glioblastoma multiforme.

Demonstrando a necessidade e importância deste trabalho no aprimoramento das técnicas de detecção precoce, justificando a realização deste.

Objetivos

Gerais:

Determinar o perfil metabolômico diferencial em plasma sanguíneo de pacientes acometidos por glioblastoma multiforme, quando comparado a um grupo controle saudável, buscando por biomarcadores diagnósticos e obtenção de informações relevantes que possibilitem melhor entendimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos com a doença.

Específicos:

- Detectar o perfil diferencial de metabólitos em amostras de plasma de pacientes acometidos por glioblastoma multiforme e de doadores saudáveis por espectrometria de massas;
- Selecionar os marcadores de acordo com suas relações massa/carga (*m/z*) que apresentem intensidade diferencial entre os grupos estudados;
- Investigar, em plataformas *online*, de moléculas candidatas cujas relações massa/carga (*m/z*) correspondam aos marcadores selecionados;
- Verificar os perfis de fragmentação das moléculas candidatas *in silico* (software HighChem Mass Frontier, Thermo Scientific) e *in vitro* (espectrometria de massas *in tandem* - MSMS);
- Caracterizar biologicamente as moléculas candidatas a marcadores da doença.

Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP mediante parecer 3.491.414 (CAAE 16610019.9.0000.5411) e foi conduzido de acordo com os protocolos da Declaração de Helsinki de 1964 (revisado em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000). Tais amostras são remanescentes de um estudo anterior ("Estudo das alterações genéticas da Interleucina 28B em Astrocitomas", aprovação CEP 097423/2014) e estavam armazenadas no biobanco do laboratório de biologia molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB). O presente estudo recebeu autorização para dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos participantes.

Casuística:

Foram analisadas amostras congeladas de plasma sanguíneo provenientes de 24 pacientes acometidos por glioblastoma multiforme e de 50 doadores saudáveis. A casuística foi acompanhada pelo Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Coleta:

O plasma foi obtido a partir de 3 mililitros de sangue periférico coletado em tubo com anticoagulante EDTA, adequado para separação de plasma. Essas amostras permaneceram armazenadas em freezer -72ºC até o momento análise.

Preparo da Amostra:

Para a extração dos metabólitos, uma alíquota de 20 µL de plasma sanguíneo, dos doadores e das amostras congeladas, foi dissolvido em 200 µL de tetrahidrofurano (THF). A amostra foi então submetida à agitação em *vortex* por 30 segundos e posteriormente, à centrifugação a 3.200 rpm, por 5

minutos, a 4ºC. O sobrenadante contendo os metabólitos foi coletado, ao qual adicionou-se 780 µL de metanol. Em seguida, a solução foi novamente submetida a centrifugação com os mesmos parâmetros citados anteriormente. A 50 µL deste sobrenadante foram adicionados metanol, grau HPLC (q.s.p. 500 µL), homogeneizado e submetido à ionização química com 1 µL de ácido fórmico. Essa solução ionizada foi então enviada para análise em Espectrômetro de Massas Linear Trap Quadrupole (LTQ), cuja fonte de ionização utilizada foi baseada em *electrospray* (ESI). Os íons carregados foram analisados quanto a relação *m/z* e intensidade de sinal, o que gerou um conjunto de íons próprio de cada amostra. Para cada amostra biológica foram retiradas duas alíquotas e cada uma destas alíquotas foi injetada 5 vezes no espectrômetro, gerando assim, um total de 10 espectros de massas para cada uma das amostras congeladas de pacientes, assim como para os doadores (grupo controle).

Análise por Espectrometria de Massas de Alta Resolução:

Todas as amostras foram diretamente injetadas no equipamento ESI-LTQ-XL Discovery® (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) de acordo com os seguintes parâmetros:

- fluxo da amostra de 10 µL por minuto;
- temperatura do capilar a 180°C;
- 7 kV de tensão no spray;
- gás de arraste em 2 unidades arbitrárias.

A análise por Espectrometria de Massa (Mass Spectrometry – MS) foi realizada em duas alíquotas de cada amostra (duplicata biológica). Foram analisadas cinco injeções de cada replicada biológica, totalizando dez leituras.

As amostras foram analisadas no modo positivo, sendo que a faixa de massa definida para a análise das amostras foi de 100-1400 *m/z*. Esta faixa de massas foi selecionada, para que fossem detectados apenas moléculas com baixa massa molecular, condizentes com a maioria dos metabólitos

importantes em diversas vias bioquímicas (39), além da sua compatibilidade com os *softwares* disponíveis para as fragmentações *in sílico* (40).

Todas as análises foram realizadas em parceria, no laboratório Inovare De Biomarcadores, da F.C.M.-UNICAMP.

Duas estratégias básicas são empregadas para uma análise metabolômica. A análise *targeted* tem como alvo de estudo determinadas classes de compostos envolvidos com rotas metabólicas conhecidas e específicas, visando sua quantificação. A análise *untargeted* é direcionada para o perfil (*fingerprinting*) dos metabólitos presentes em uma amostra, sendo qualitativa (41). Para o presente estudo foi aplicada a análise *untargeted*, para que fosse possível encontrar qualquer metabólito que apresentasse seu padrão alterado nas amostras congeladas de pacientes; isto possibilita uma análise mais ampla, sem alvos específicos, onde há a possibilidade de serem encontrados metabólitos que ainda não foram associados a presença de câncer na literatura atual.

Análise estatística:

Os dados brutos dos espectros de massas foram submetidos à análise estatística por meio da plataforma virtual *MetaboAnalyst* 3.0® (https://www.metaboanalyst.ca/). Na mesma ferramenta, os dados foram avaliados pelo método estatístico multivariado de análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) (do inglês *Partial Least Squares - Discriminant Analysis*).

O cálculo de *Fold Change* (FC) também foi utilizado para diferenciação dos dois grupos (CT e GBM). Trata-se de uma medida capaz de descrever o quanto uma variável muda proporcionalmente entre um grupo controle (CT) e o grupo analisado (GBM). Por exemplo, em GBM / CT, um FC = 2 significa que o valor observado em GBM é duas vezes maior do que o valor do CT. O valor de FC é assimétrico em torno de 1, ou seja, quando o valor medido é maior no grupo analisado (GBM) do que o controle, o valor de FC irá variar de 1 a um número potencialmente muito alto, já quando o valor medido é menor

no grupo analisado (GBM) do que o controle, o valor de FC irá variar apenas de 0 a 1. Assim, para facilitar a interpretação das proporções, é comum a conversão desse valor linear (FC) para escala logarítmica (Log2), tornando o valor simétrico em torno de 0. Dessa forma, quando o grupo analisado (GBM) é maior do que o controle, a proporção transformada em *log2* será maior do que 0; quando o grupo analisado (GBM) é menor que o controle, a razão log2-transformada é menor que 0. Ambas as direções estão na mesma escala (simétrica) (42, 43 e 44). Por exemplo:

para FC = 2 → *log2FC* 2 = 1

para FC = 0,5 → *log2FC* 0,5 = -1

A partir dos metabólitos selecionados foi construída a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), que avaliou a acurácia de cada marcador ou um conjunto de marcadores para discriminar as amostras dos pacientes acometidos por GBM das amostras dos controles saudáveis.

Resultados e Discussão

Caracterização da casuística

O principal objetivo desse estudo foi analisar o perfil metabolômico diferencial em plasma sanguíneo de pacientes acometidos por glioblastoma multiforme comparados ao plasma de doadores saudáveis, buscando por biomarcadores diagnósticos, além da obtenção de informações relevantes que possibilitem melhor entendimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos com a doença. Baseado nisto, a casuísta utilizada para as análises é a demonstrada na tabela 2, que apresenta os dados clínicos e epidemiológicos dos voluntários e doadores.

Tabela 2 – Dados clínicos e epidemiológicos da casuística analisada.

Variáveis	**Glioblastoma** n=24	**Controle** n=50
Idade		
Média	55,6	42,4
Mediana	57,5 (20 a 79 anos)	41,5 (22 a 80 anos)
Gênero		
Masculino	15 (62,5%)	25 (50%)
Feminino	9 (37,5%)	25 (50%)

Perfil Metabolômico

Os metabólitos presentes em amostras de plasma de pacientes acometidos por glioblastoma e de doadores saudáveis foram analisados por espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* - MS) e quimiometria. A estratégia empregada foi a análise *untargeted*, direcionada para o perfil qualitativo dos metabólitos presentes na amostra. Em um típico experimento, a amostra é injetada no espectrômetro de massas, ionizada e vaporizada, resultando em íons que são separados de acordo com sua relação massa/carga (*m/z*). Os dados espectrais gerados para cada amostra foram tratados por análise estatística multivariada PLS-DA (do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) utilizando o software MetaboAnalyst 3.0® (45) na busca por criar o melhor modelo discriminativo entre os grupos GBM (glioblastoma) e CT (controle).

A aplicação do método PLS-DA é ilustrada na figura 1, em que uma boa separação visual dos grupos de amostras pode ser obtida, sugerindo que o perfil metabólico plasmático do grupo GBM é consideravelmente diferente do grupo CT.

Esta figura apresenta na forma de pontos, os dados dos marcadores identificados em cada uma das análises, tanto dos pacientes acometidos de GBM (representado em verde), quanto do grupo controle (representado em

vermelho), onde é possível verificar o intervalo de confiança, representado pelas sombras em verde (para o GBM) e em rosa (para o grupo controle).

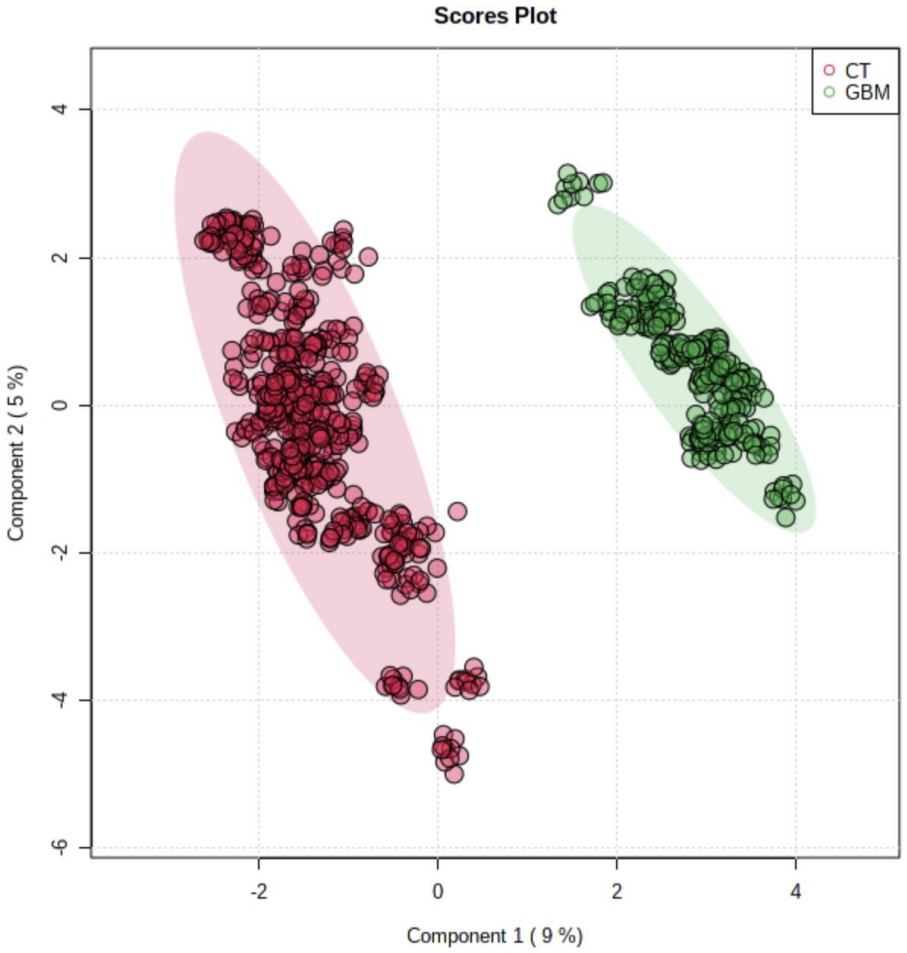


Figura 1 – Análise multivariada (PLS-DA): separação visual dos perfis metabólicos em espaço multidimensional. As regiões sombreadas em rosa e verde ao redor dos pontos representam o intervalo de confiança de 95% para os grupos CT e GBM, respectivamente. Cada ponto representa uma replicata dentre as dez analisadas para cada amostra.

Adicionalmente, foram identificados os íons marcadores (*m/z*) com maior efeito discriminante para cada grupo em particular - *VIP Score* (Importância da Variável na Projeção). A figura 2 mostra os principais metabólitos (íons identificados pela massa) capazes de diferenciar os grupos GBM e CT.

Nela é possível identificar os metabólitos que estão alterados no grupo dos paciente (GBM) comparados aos voluntários saudáveis (grupo controle), onde, os metabólitos que estão em quantidade maior que o normal são representados pela cor vermelha, na coluna da direita do gráfico e os metabólitos que tiveram suas expressões diminuídas são representados pela cor verde na mesma coluna.

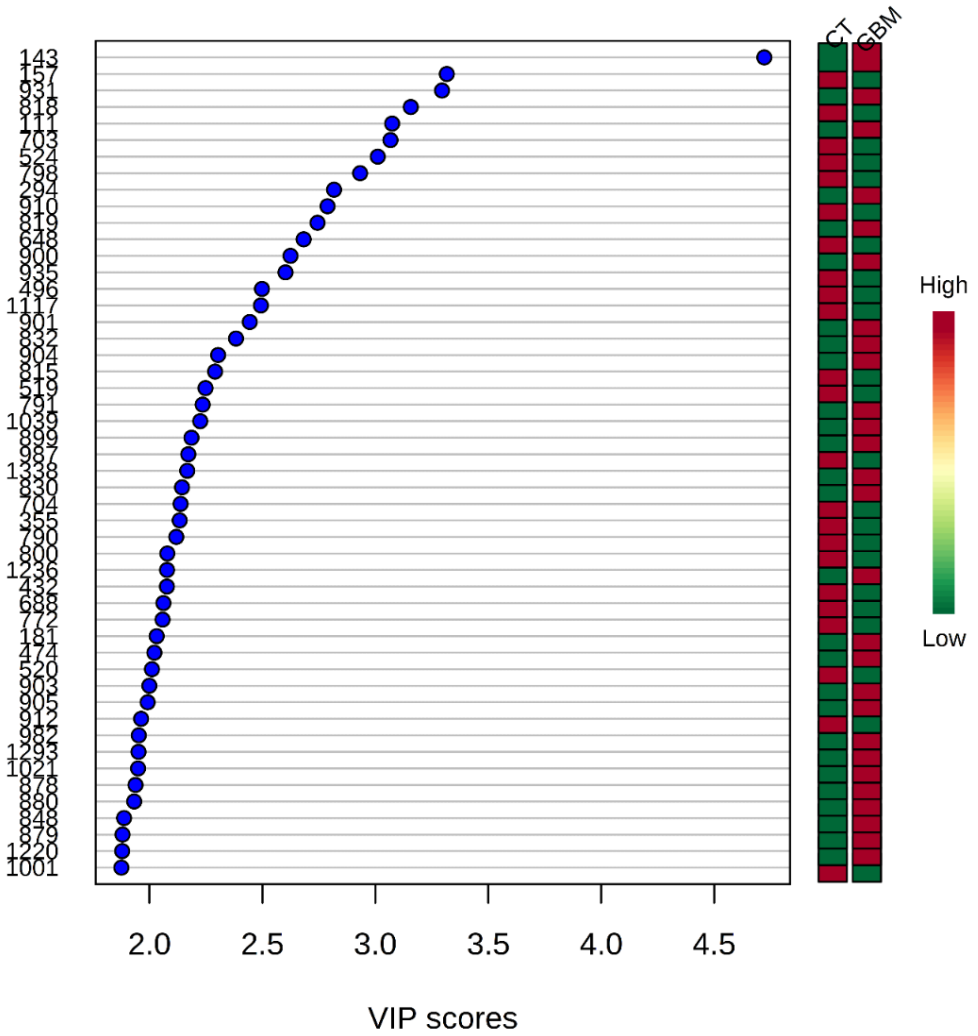


Figura 2 – Íons marcadores (*m/z*) mais importantes para a identificação e separação dos grupos GBM e CT, segundo *VIP Score* (Importância da Variável na Projeção) da análise PLS-DA. As variáveis que apresentam valores mais distantes de 1 indicam uma maior influência na separação dos grupos. No código de cores, verde indica baixa concentração relativa e o vermelho, alta concentração relativa.

Com base nesta análise foram selecionados os cinco principais íons marcadores (*m/z*) capazes de diferenciar os dois grupos do estudo. Destes metabólitos, identificados pela sua massa molecular nesse estágio do estudo, foram selecionados os cinco marcadores com melhor VIP Score e maior abundância relativa no grupo GBM: 143, 931, 111, 294 e 819.

Adicionalmente, uma análise de Log2 Fold Change (Log2FC) também foi aplicada para determinar as alterações de abundância relativa entre os grupos. Especificamente, foram considerados metabólitos diferenciais aqueles em que o valor Log2FC fosse maior que 1 e p-valor menor que 0,05. A análise indicou os íons mais abundantes no grupo GBM, quando comparado ao grupo CT. Destes, foram selecionados cinco íons marcadores: 931, 294, 112, 936 e 982, conforme o gráfico ilustrado na figura 3:

O íon de massa 112 foi identificado como sendo isótopo do íon de massa 111, assim, somente a massa 111 foi considerada para as análises subsequentes.

Na figura é possível identificar os marcadores que estão mais abundantes em cada grupo, onde o Log2, demonstra que aquele marcador está no mínimo com o dobro da abundância, com relação ao outro grupo. As linhas tracejadas, separam os marcadores com Log2 FC maior que 1 para cada grupo (GBM para cima e CT para baixo), onde os pontos em rosa representam os principais marcadores utilizados para separar os dois grupos.

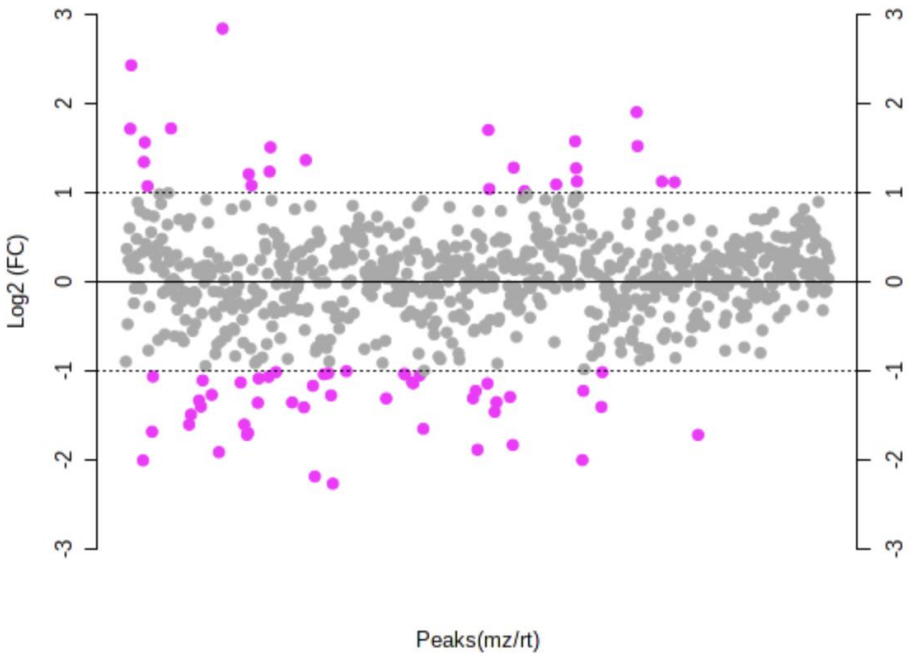


Figura 3 – Abundância relativa dos íons marcadores (*m/z*) de acordo com o log2 Fold Change calculado pela razão entre as amostras de Glioblastoma e as amostras Controle (GBM/CT). As linhas tracejadas indicam Log2FC ±1 e os pontos rosas indicam marcadores com log2 Fold-change >1.

As massas dos íons marcadores mais representativas para a diferenciação dos dois grupos (CT e GBM), tanto por metodologia PLS-DA quanto por Log2FC foram pesquisadas nos bancos de dados de metabolômica: METLIN, *Human Metabolome Database* (HMDB) e *Lipid Maps*.

Para cada provável metabólito indicado nos bancos de dados, foi realizada uma revisão nas bases metabolômicas (METLIN, HMDB e PubChem) e publicações atuais da área, em busca de associações anteriores com câncer ou doença relacionada (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultado da pesquisa das massas diferencialmente abundantes no grupo glioblastoma na plataforma METLIN.

Massa experimental	Número de possíveis metabólitos*	Número de metabólitos selecionados#
143	3772	83
931	566	7
111	2716	25
294	4000	23
819	818	7
936	562	5
982	419	6

*Retorno do METLIN para cada massa pesquisada; #Metabólitos previamente associados a câncer.

Cada um dos metabólitos selecionados após revisão foi submetido a fragmentação molecular com o software HighChem Mass Frontier (v.6.0, Thermo Scientific, San Jose, California, USA). Também, replicatas técnicas dos plasmas inicialmente analisados foram submetidas a fragmentação por espectrometria de massas *in tandem* (MSMS), para posterior comparação entre os perfis de fragmentação obtidos *in silico* e *in vitro*.

Após comparação, as moléculas que apresentaram perfis de fragmentação equivalentes seguiram para a etapa de identificação e caracterização química, apresentada na tabela 4, onde estão descritos a massa carga (*m/z*), nome, fórmula molecular, aduto, principais fragmentos e Log2FC.

Tabela 4 – Metabólitos plasmáticos que diferenciam os pacientes acometidos por Glioblastoma Multiforme (GBM).

Relação Massa/Carga (m/z)	ID Base de Dados	Metabólito (em inglês)	Fórmula Molecular	Adutos	MS/MS*	Log2FC#
294	MID 44796	O-Benzyl-L-Tyrosine	$C_{16}H_{17}NO_3$	$[M+Na]^+$	268-254-250-236-266	2.7526
294	MID 85632	Arginyl-Proline	$C_{11}H_{21}N_5O_3$	$[M+Na]^+$	268-254-250-236-266	2.7526
931	HMDB 00024	3-O-Sulfogalactosylceramide (d18:1/24:0)	$C_{48}H_{93}NO_{11}S$	$[M+K]^+$	109, 112, 121, 135, 184	2.4353
982	LMGP 02010358	NAPE (N-acylphosphatidylethanolamine)	$C_{57}H_{108}NO_9P$	$[M+H]^+$	644-360-113-184	1.9059
936	HMDB 03939	3-Oxodecanoyl-CoA	$C_{31}H_{52}N_7O_{18}P_3S$	$[M+H]^+$	522-184-113	1.8450
111	HMDB 00243	Pyruvate	$C_7H_{12}O_2$	$[M+ Na]^+$	69-55-93-83	1.7035
143	MID 5456	5-Hydroxymethyluracil	$C_5H_6N_2O_3$	$[M+H]^+$	116, 111, 117, 97, 125	1.3418
819	HMDB 0112503	PS (18:4)/(20:5)	$C_{44}H_{68}NO_{10}P$	$[M+NH_4]^+$	184-636-760-147-113	1.1817

*MS/MS - fragmentação por espectrometria de massas in tandem;
#Log2FC: Log2 Fold Change representa a razão de abundância entre as amostras de GBM e as amostras Controle.

Caracterização dos Metabólitos e Análise do Potencial para Biomarcador

A caracterização estrutural e funcional dos metabólitos, bem como a identificação prévia do seu envolvimento com outros tipos de cânceres pode fornecer informações relevantes, contribuindo para o entendimento da fisiologia desse tipo de tumor. Alguns dos metabólitos analisados ainda não foram associados à presença de qualquer tipo de câncer na literatura científica disponível, representando informações inéditas sobre o tema.

Para verificar se os metabólitos selecionados representam biomarcadores acurados para GBM foi realizada uma análise preliminar baseada na construção de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve)* para cada um dos metabólitos. A curva ROC é uma técnica gráfica utilizada para avaliar a capacidade de um teste de diagnóstico fazer a distinção entre os doentes (GBM) e os não doentes (CT). A curva é obtida pela representação dos valores de sensibilidade e especificidade em pontos de coordenadas, onde, por convenção, a sensibilidade é representada no eixo das ordenadas (Y) e a especificidade é representada no eixo das abcissas (X), variando ambas de 0 a 1 (0-100%) (46).

Sensibilidade é capacidade do marcador de identificar corretamente os indivíduos doentes e é quantificada pela razão entre o diagnóstico verdadeiro positivo (VP) e o total de casos positivos (VP e falso negativos): (VP/(VP+FN)); **Especificidade** é a capacidade do marcador de identificar corretamente os indivíduos que não possuem a doença e é calculada pela razão entre os casos diagnosticados como não doentes (VN) pelo total de todos os casos negativos (VN e falso positivos): (VN/(VN+FP)) (46).

Foram considerados como bons ou excelentes biomarcadores aqueles metabólitos com Área Sob a Curva (AUC) maior que 0,8, alta sensibilidade e alta especificidade. AUC, do inglês *Area Under the ROC Curve*, é uma medida estatística que avalia se o modelo sugerido (nesse caso, o metabólito) é acurado para discriminar o que se propõe; uma AUC elevada indica que o

modelo é preciso e que o teste diagnóstico terá ótimo desempenho. As regras gerais (47) para se interpretar valores AUC são:

AUC = 0,5	- Sem discriminação (resultados aleatórios)
0,7 ≤ AUC < 0,8	- Discriminação aceitável
0,8 ≤ AUC < 0,9	- Discriminação excelente
AUC ≥ 0,9	- Discriminação Notável (muito rara)

Assim, quanto mais perto a curva ROC ficar localizada ao canto superior esquerdo do gráfico e quanto maior a AUC, melhor é o teste para discriminar entre doentes e não doentes.

A seguir são caracterizadas os metabólitos selecionados no presente estudo como candidatos a biomarcadores para GBM e são apresentadas as análises de acurácia baseadas nas curvas ROC:

5-hidroximetiluracil (5-Hydroxymethyluracil)

O 5-hidroximetiluracil (5hmU), também conhecido como alfa-hidroxitimina (48), pertence à classe dos compostos orgânicos conhecidos como pirimidonas. O 5-hidroximetiluracil é um composto básico extremamente fraco (essencialmente neutro) e potencialmente tóxico, com massa molar 142,11 g/mol, figura 4 (48).

5-hidroximetiluracil é produzido através da oxidação/hidroxilação da timina, resultando na formação da 5-hmU emparelhada com adenina, reação provocada por espécies reativas de oxigênio (ROS). Pode ainda ser formada quando ROS reagem com 5-metilcitosina (5-mC) formando 5-hidroximetilcitosina, reação que pode ser seguida por desaminação para 5-hidroximetiluracil mal pareada com a guanina, contudo, existem alguns mecanismos enzimáticos que também são considerados na sua origem e colaboram com este processo (49).

Estudos sugerem seu envolvimento com a instabilidade genômica, uma vez que pode ser removido por enzimas de reparo de DNA, criando danos potencialmente mutagênicos (50 e 51). Além disso, o marcador apresenta

papel altamente provável nos eventos de desmetilação no DNA, e modificações epigenéticas importantes (52).

Já foi observada elevação na concentração desta base no sangue de mulheres acometidas por câncer de mama (53), sugerindo seu potencial como um biomarcador para a doença.

Frenkel et al. (54) analisaram o soro de 169 mulheres, pelo método ELISA, saudáveis na época da coleta e que, após 0,5 – 6 anos, foram diagnosticadas com câncer de mama ou colorretal. Em todos os casos foi detectada elevação significativa do autoanticorpo anti-5hmU, que foi considerado marcador para cânceres. Ainda, seis mulheres que apresentaram diagnóstico de câncer retal tinham níveis aumentados de anti-5hmU (44,80 +/- 11,50); outras 33 mulheres que tiveram diagnóstico de câncer de cólon também apresentaram aumento de anti-5hmU (29,03 +/- 2,49) e também, outras 9 mulheres diagnosticadas com câncer de mama demonstraram um aumento nos níveis do autoanticorpo (35,86 +/- 8,55).

Após a excisão do DNA, as bases alteradas possivelmente serão liberadas na corrente sanguínea e, eventualmente, aparecerão na urina. Assim, supõem-se que, a detecção de níveis acima do esperado desses compostos na urina reflete a atividade das vias de reparo (55 e 56) e algo similar pode ser considerado para plasma e soro sanguíneos.

É digno de nota que não há relatos sobre correlações entre esse potencial marcador e o glioblastoma multiforme, conferindo originalidade aos resultados do presente estudo.

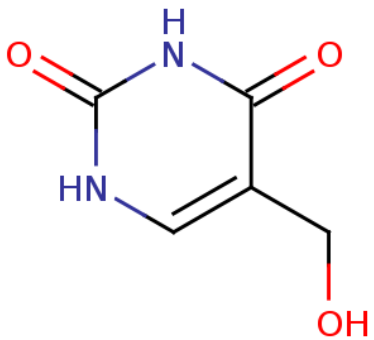
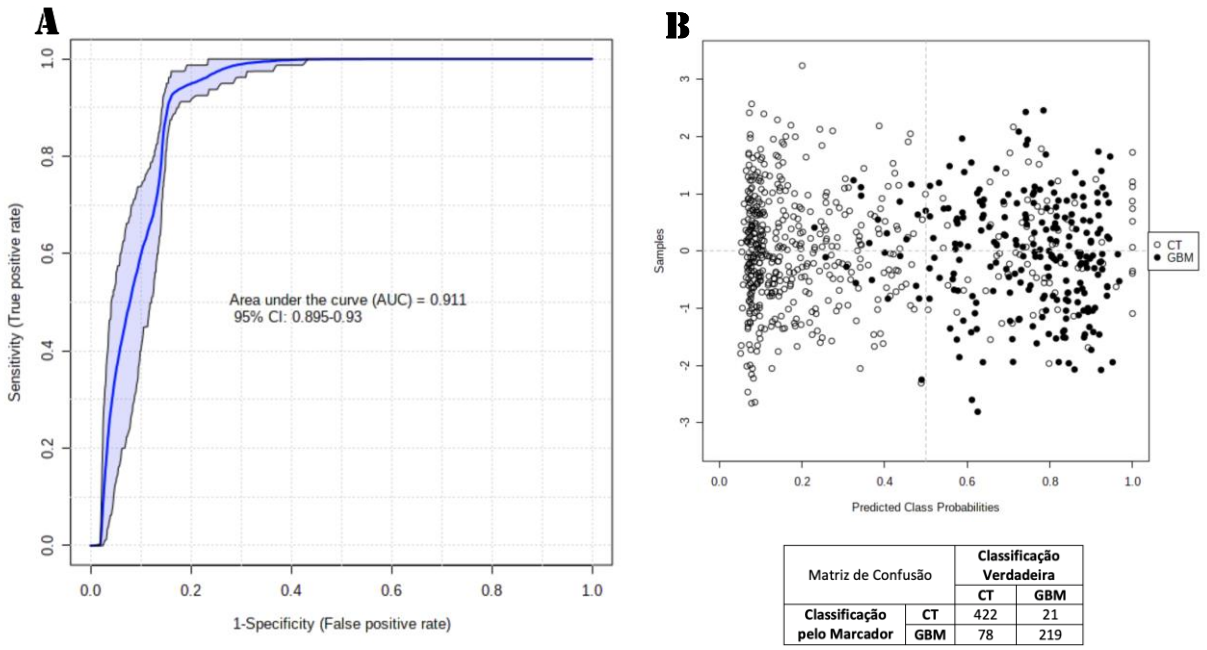


Figura 4 - Estrutura química do 5-hidroximetiluracil

(fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Hydroxymethyluracil)

A curva ROC construída para avaliar o modelo baseado no metabólito 5-hidroximetiluracil é apresentada na figura 5.



Matriz de Confusão		Classificação Verdadeira	
		CT	GBM
Classificação pelo Marcador	CT	422	21
	GBM	78	219

Figura 5 – Análise de acurácia do metabólito 5-hidroximetiluracil como biomarcador de GBM. **A) curva ROC**, onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%; **B) Gráfico** demonstrativo das probabilidades das classificações previstas de cada replicata (n=10), os pontos pretos representam as replicatas das amostras de GBM e os pontos brancos representam as replicatas de cada CT, a linha pontilhada indica o limite da classificação (x = 0,5). A matriz de confusão é fornecida abaixo do gráfico.

A área sob a curva (AUC) foi calculada em 91,1%, a sensibilidade e especificidade de 91,3% e 84,4%, respectivamente. Esses dados sugerem que esse metabólito discrimina com acurácia as amostras de pacientes acometidos por GBM dos indivíduos saudáveis (CT), deixando de identificar 2 dos 24 pacientes com GBM analisados. Contudo, esse modelo deve ser testado em um número expandido de amostras e outras condições patológicas para que possa ser avaliado o seu potencial como biomarcador exclusivo de GBM.

***Ácido pirúvico* (Pyruvic acid)**

O ácido pirúvico (figura 6) é gerado no metabolismo dos carboidratos, como composto intermediário, proveniente do metabolismo da glicose no organismo. Faz parte da classe de compostos dos ácidos orgânicos e derivados, como massa molar de 88,06 g/mol.

Altas concentrações de piruvato já foram relatadas em alguns tipos de câncer. Portadores de certos tipos de leucemia e diabéticos que apresentam acidose, podem acumular altas taxas de piruvato, que resulta em sintomas como náuseas, vômitos, fadiga, perda de peso e quadros de diarreia, alguns dos quais se assemelham a sintomas presentes em pacientes com glioblastoma (57).

Diversos estudos associaram o piruvato com alterações no metabolismo central do carbono no câncer (58, 59, 60 e 61). Durante o processo de obtenção de energia na forma de ATP, todas as células oxidam parcialmente a glicose à piruvato, fenômeno conhecido como glicólise. No final deste processo, o piruvato é então oxidado, gerando o CO_2 e grande concentração de íons hidrogênio e elétrons, que são recebidos por coenzimas, que em seguida sofrem oxidação, liberando desta forma grande quantidade de ATP (57). Neste processo, diferentes enzimas atuam ao longo das reações químicas para catalisar e garantir o fornecimento de substrato adequado para a geração de energia celular. Dentre elas, algumas enzimas são particularmente importantes para os gliomas, como a enzima isocitrato desidrogenase 1 (IDH1). Tem se observado que linhagens de gliomas com mutação na enzima IDH1 também apresentam atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH) reduzida, resultando na redução da conversão de piruvato a Acetil-CoA, prejuízo do ciclo de Krebbs e provável acúmulo de piruvato no citoplasma (62).

Outras alterações também foram demonstradas por Ikeda e colaboradores (63) os quais relacionaram alterações nos níveis do ácido pirúvico, juntamente com o ácido 3-hidroxipropiônico, com a presença de câncer gástrico, utilizando metabolômica como ferramenta para identificação

de marcadores da doença. O aumento do metabólito foi capaz de diferenciar este tipo de câncer das amostras de soro de indivíduos saudáveis, mesmo em estágios precoces da doença. Com base nas informações supracitadas, o piruvato pode representar um marcador para câncer, como apresentado no presente trabalho e sugerido por Ikeda e colaboradores.

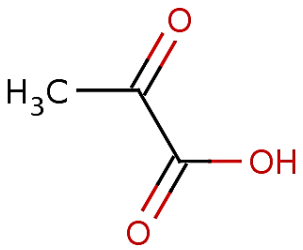
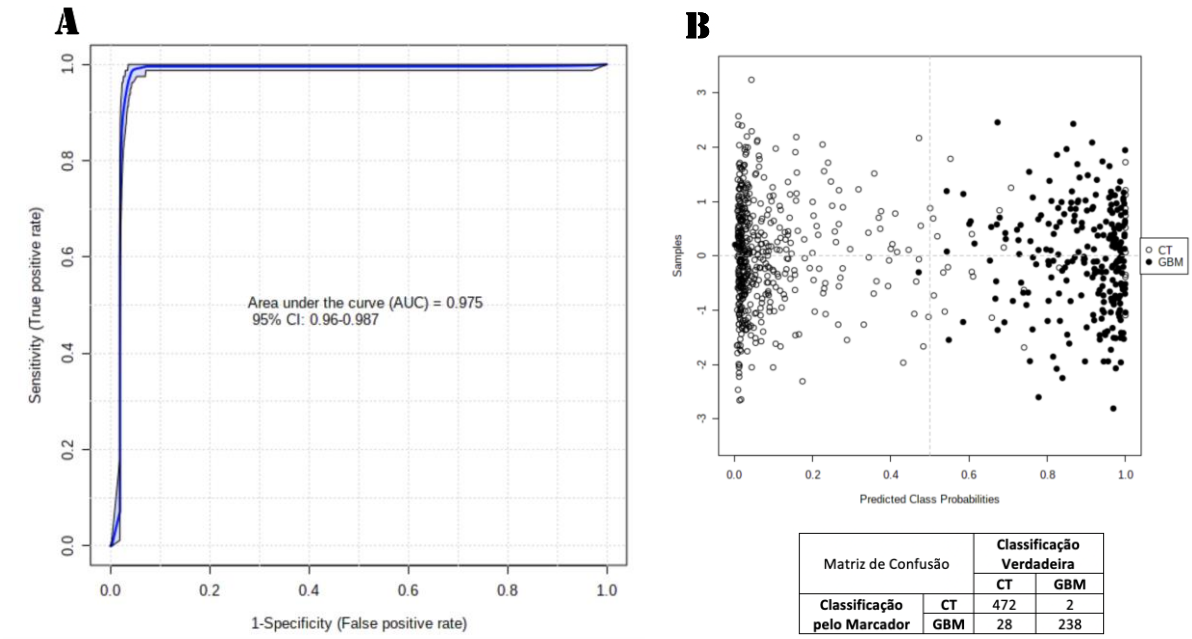


Figura 6 - Estrutura química do Ácido pirúvico

(fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyruvic-acid)

A curva ROC construída para avaliar o modelo baseado no ácido pirúvico é apresentada na figura 7.



Matriz de Confusão		Classificação Verdadeira	
		CT	GBM
Classificação pelo Marcador	CT	472	2
	GBM	28	238

Figura 7 – Análise de acurácia do metabólito ácido pirúvico como biomarcador de GBM. **A) curva ROC**, onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%; **B) Gráfico** demonstrativo das probabilidades das classificações previstas de cada replicata (n=10), os pontos pretos representam as replicatas das amostras de GBM e os pontos brancos representam as replicatas de cada CT, a linha pontilhada indica o limite da classificação (x = 0,5). A matriz de confusão é fornecida abaixo do gráfico.

A área sob a curva (AUC) foi calculada em 97,5%, a sensibilidade e especificidade de 99,2% e 94,4%, respectivamente. Esse metabólito apresentou o melhor desempenho como biomarcador da doença, com altíssima sensibilidade e considerável especificidade. Entretanto, alterações nas concentrações do piruvato já foram apontadas para várias condições fisiológicas, o que pudemos notar, inclusive, em nosso grupo de doadores saudáveis. Contudo, vale ressaltar que, embora esse biomarcador pareça não ser adequado para uso individual, poderia ser combinado a outros marcadores para aumentar a acurácia do diagnóstico.

Arginil-Prolina (Arginyl-Proline)

Classificado como um dipeptídeo, constituído pela ligação peptídica entre os aminoácidos arginina e prolina (figura 8), ambos derivados do glutamato, ligeiramente solúvel em água, possuindo uma massa molar de 271,3 g/mol.

Estudo metabolômicos em fezes liofilizadas de 48 pacientes acometidos de câncer colorretal (CRC) e 102 voluntários saudáveis (controle), detectaram 18 peptídeos, que estavam abundantes nos pacientes em relação ao grupo de controle. Dentre estes peptídeos encontrados, foi identificado o dipeptídeo arginil-prolina (64).

Contudo, também deve ser considerado que os dois marcadores supracitados, encontrados em nossa casuística, possam refletir a liberação causada pelos altos níveis de divisão celular, morte celular e degradação de proteínas (64).

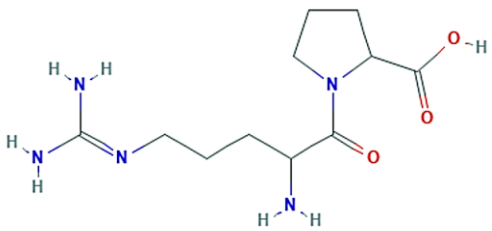
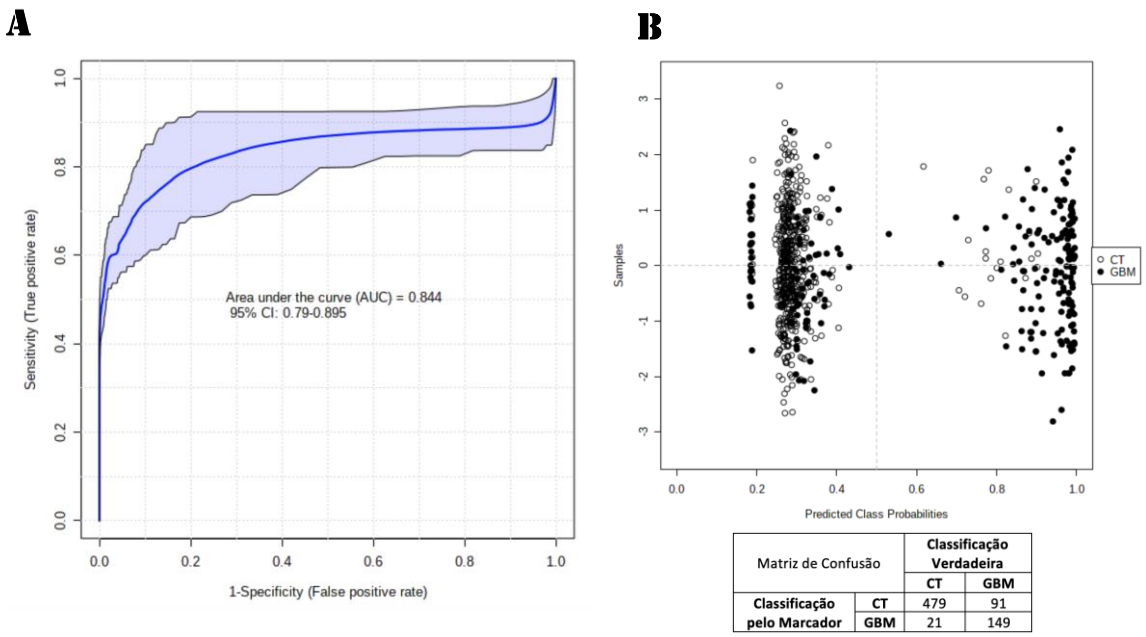


Figura 8 - Estrutura química da Arginil-Prolina

(fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/332964)

A acurácia da Arginil-Prolina calculada a partir da construção da curva ROC, é apresentada na figura 9.



Matriz de Confusão		Classificação Verdadeira	
		CT	GBM
Classificação pelo Marcador	CT	479	91
	GBM	21	149

Figura 9 – Análise de acurácia do metabólito Arginil-Prolina como biomarcador de GBM. **A) curva ROC**, onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%; **B) Gráfico** demonstrativo das probabilidades das classificações previstas de cada replicata (n=10), os pontos pretos representam as replicatas das amostras de GBM e os pontos brancos representam as replicatas de cada CT, a linha pontilhada indica o limite da classificação (x = 0,5). A matriz de confusão é fornecida abaixo do gráfico.

A área sob a curva (AUC) foi calculada em 84,4%, a sensibilidade e especificidade de 62,1% e 95,8%, respectivamente. Os valores para AUC sugerem uma boa acurácia desse metabólito para discriminar as amostras de GBM das dos controles (CT), contudo, embora a especificidade seja muito boa, exibe uma sensibilidade menor (62%), quando comparada aos outros marcadores estudados, revelando que não seria adequado o uso isolado desse marcador.

3-oxodecanoil-CoA (3-Oxodecanoyl-CoA)

3-Oxodecanoil-CoA é um intermediário no metabolismo de ácidos graxos, substrato da enzima acetil-Coenzima A acetiltransferase 1 e 2 e pode transferir grupos acil entre entidades moleculares. Trata-se de um tioéster de acila lipídica, cuja massa molar é 935,23 g/mol (figura 10). É um estabilizador de membrana, nutriente celular, armazenador e fonte de energia celular (65). Considerando a energia celular, os gliomas podem apresentar plasticidade metabólica, de acordo com a disponibilidade de nutrientes do ambiente tumoral. Em tumores com origem em células da glia, o metabolismo lipídico encontra-se bastante alterado. Tais alterações podem representar modificações do metabolismo energético celular, como a oxidação de ácidos graxos, a qual está diretamente associada à geração de ATP mitocondrial, a partir da beta-oxidação. Considerando que o biomarcador identificado, 3-oxodecanoil-CoA, é um intermediário da β-oxidação de lipídeos, é plausível que sua identificação se deva à plasticidade metabólica das células tumorais, que priorizam a geração de ATP a partir das fontes que lhes são mais acessíveis de acordo com a fase de expansão do tumor (66).

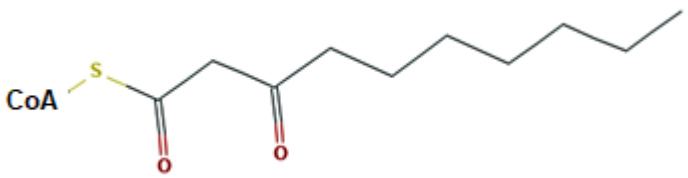
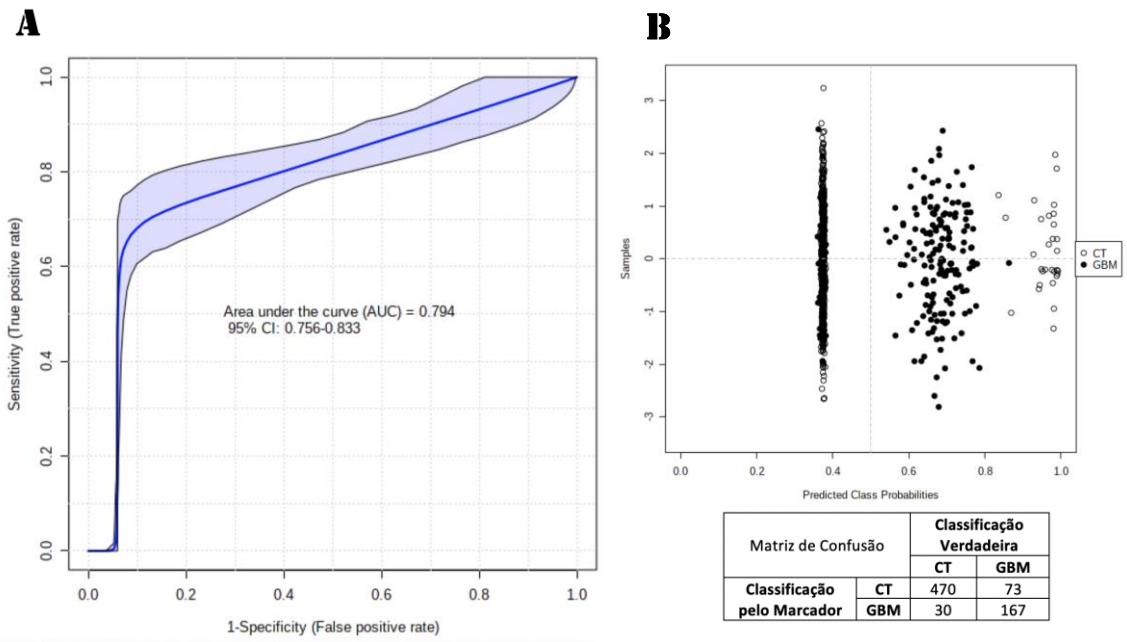


Figura 10 - Estrutura química de 3-oxodecanoil-CoA

(Adaptado de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Oxodecanoyl-CoA)

A figura 11 apresenta a curva ROC para a 3-oxodecanoil-CoA.



Matriz de Confusão		Classificação Verdadeira	
		CT	GBM
Classificação pelo Marcador	CT	470	73
	GBM	30	167

Figura 11 – Análise de acurácia do metabólito 3-oxodecanoil-CoA como biomarcador de GBM. **A) curva ROC**, onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%; **B) Gráfico** demonstrativo das probabilidades das classificações previstas de cada replicata (n=10), os pontos pretos representam as replicatas das amostras de GBM e os pontos brancos representam as replicatas de cada CT, a linha pontilhada indica o limite da classificação (x = 0,5). A matriz de confusão é fornecida abaixo do gráfico.

A área sob a curva (AUC) foi calculada em 79,4%, a sensibilidade e especificidade de 69,6% e 94%, respectivamente. Esses dados sugerem que esse metabólito discrimina com relativamente boa acurácia as amostras de pacientes acometidos por GBM dos indivíduos saudáveis (CT). A especificidade é alta, todavia, esse modelo deixou de apontar aproximadamente 7 em 24 casos de GBM. Esses resultados revelam que esse marcador não deveria ser utilizado sozinho em um potencial teste diagnóstico.

3-O-Sulfogalactosilceramida (3-O-Sulfogalactosylceramide D18: 1/24: 0)

Este glicoesfingolipídeo sulfatado ácido (figura 12), de massa molar igual a 779,52 g/mol, pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como sulfatídeos (67); é um lipídio presente nas membranas de vários tipos de células, localizado principalmente em membrana celular, lisossomo

endossomos e em concentrações altas na bainha de mielina. É sintetizado principalmente nos oligodendrócitos do sistema nervoso central (68 e 69).

Diferentes tipos de linhagens tumorais apresentam elevação dos níveis de sulfatídeos, o que os torna potenciais biomarcadores de câncer (70, 71 e 72). Alguns estudos com linhagens tumorais têm mostrado que os sulfatídeos podem estar associados ao risco de metástase (73 e 74). Esse risco se deve à sua capacidade de atuar como ligantes de P-selectinas, proteínas normalmente presentes em células endoteliais e leucócitos, por exemplo, e que, no ambiente tumoral, apresentam papel importante no espalhamento das células por meio da metástase (75). Outro ponto importante a considerar é que as P-selectinas também estão superexpressas em células de glioblastoma humano e, nesse caso, observou-se que maiores níveis de P-selectinas estão relacionadas com menor sobrevida dos pacientes (76). Portanto, a presença de sulfatídeos em maiores intensidades nos pacientes do grupo GBM pode estar relacionada ao pior prognóstico do paciente, já que está relacionada com menor sobrevida e espalhamento tumoral.

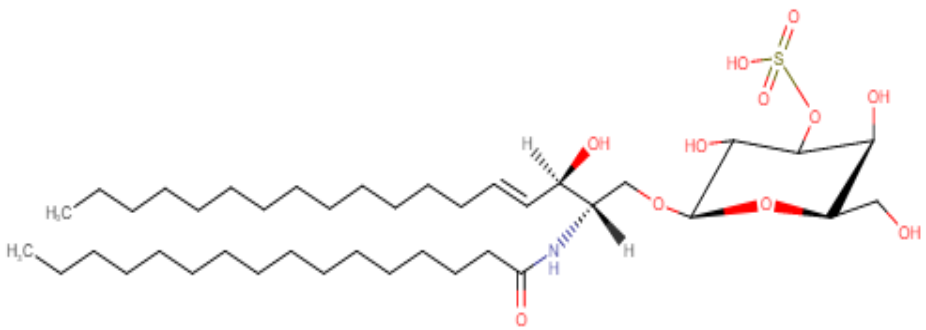
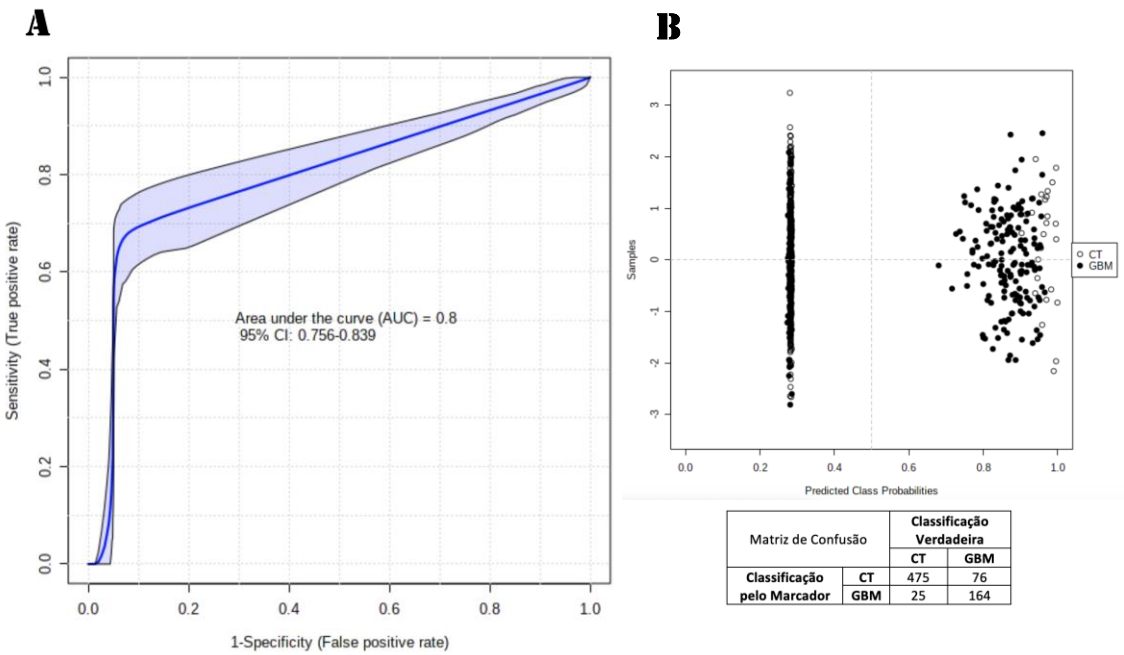


Figura 12 - Estrutura química de 3-O-Sulfogalactosilceramida

(fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6451121)

A figura 13 apresenta a curva ROC para a 3-O-Sulfogalactosilceramida.



Matriz de Confusão		Classificação Verdadeira	
		CT	GBM
Classificação pelo Marcador	CT	475	76
	GBM	25	164

Figura 13 – Análise de acurácia do metabólito 3-O-Sulfogalactosilceramida como biomarcador de GBM. **A) curva ROC**, onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%; **B) Gráfico** demonstrativo das probabilidades das classificações previstas de cada replicata (n=10), os pontos pretos representam as replicatas das amostras de GBM e os pontos brancos representam as replicatas de cada CT, a linha pontilhada indica o limite da classificação (x = 0,5). A matriz de confusão é fornecida abaixo do gráfico.

A área sob a curva (AUC) foi calculada em 80%, a sensibilidade e especificidade de 68,3% e 95%, respectivamente. A 3-O-Sulfogalactosilceramida apresentou boa acurácia discriminatória, contudo, deixou de apontar aproximadamente 8 em 24 casos de GBM. Esses resultados revelam que a 3-O-Sulfogalactosilceramida não deveria ser utilizada individualmente como biomarcador de GBM.

N-acilfosfatidiletanolamina (N-acylphosphatidylethanolamine, NAPE)

Uma amida derivada de ácido graxo, formada pela ligação de um grupo acila ao nitrogênio da etanolamina, com massa molar de 424,40 g/mol (figura 14).

N-acilfosfatidiletanolaminas (NAPEs) são hormônios com ação no hipotálamo capazes de suprimir o apetite, mas também estão diretamente

presentes na biossíntese de endocanabinóides (77 e 78). Estes atuam na modulação da liberação e ação de neurotransmissores, tanto central quanto periférica. Alguns estudos têm mostrado que o sistema endocanabinóide humano pode apresentar alterações em tumores da glia e que moléculas presentes nesse sistema poderiam ser biomarcadores endógenos desses tumores (79 e 80), como é o caso das NAPEs.

A oxidação das NAPEs foi ainda associada à ferroptose (81), um processo descoberto em 2012, ligado a morte celular. Este processo é morfológica, bioquímica e geneticamente diferente da apoptose, da necrose e da autofagia. Trata-se de um tipo de morte celular, onde há a participação de íons de ferro e não é programada. Ela está ligada à peroxidação lipídica, onde as moléculas de lipídeos das membranas celulares são degradadas, por um mecanismo catalisado pelo ferro e gerando compostos tóxicos para a célula e promovendo modificações em várias moléculas envolvidas em vias metabólicas (82).

A NAPE é ainda substrato da enzima NAPE-PLD (N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D) que libera N-aciletanolamina (NAE). As NAPEs são parte importante do processo que converte lipídios comuns em sinais químicos que atuam como ligantes do sistema endocanabinóide, como a oleoiletanolamina (OEA) (83). Um estudo baseado em lipidômica revelou a presença de grandes quantidades de OEA no plasma de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) em comparação com doadores normais (84). Os níveis plasmáticos de OEA foram diretamente relacionados ao número de células leucêmicas circulantes e, in vitro, essas células produziram OEA, refutando algumas hipóteses de que a fonte seria exclusivamente via alimentação. Ainda, doses não fisiológicas de OEA impediram a apoptose espontânea de células leucêmicas. Contudo, os sobrenadantes contendo OEA produzidos pelas células leucêmicas induziram a lipólise nos adipócitos e os produtos lipídicos dos adipócitos protegeram as células tumorais da quimioterapia, sugerindo que OEA é produzido pelas

células tumorais em LLC para a manutenção do seu crescimento, com um potencial papel na resistência a drogas quimioterápicas.

Não foram encontradas investigações anteriores a nossa sobre associações entre NAPE e glioblastoma, o que deve encorajar estudos futuros sobre o assunto.

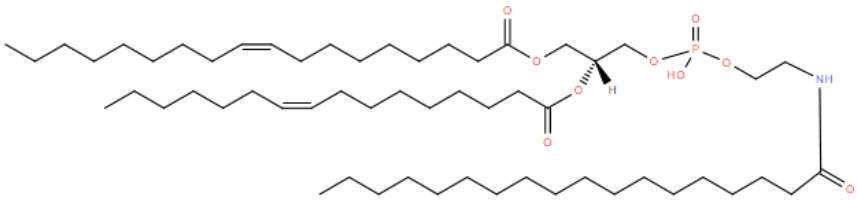
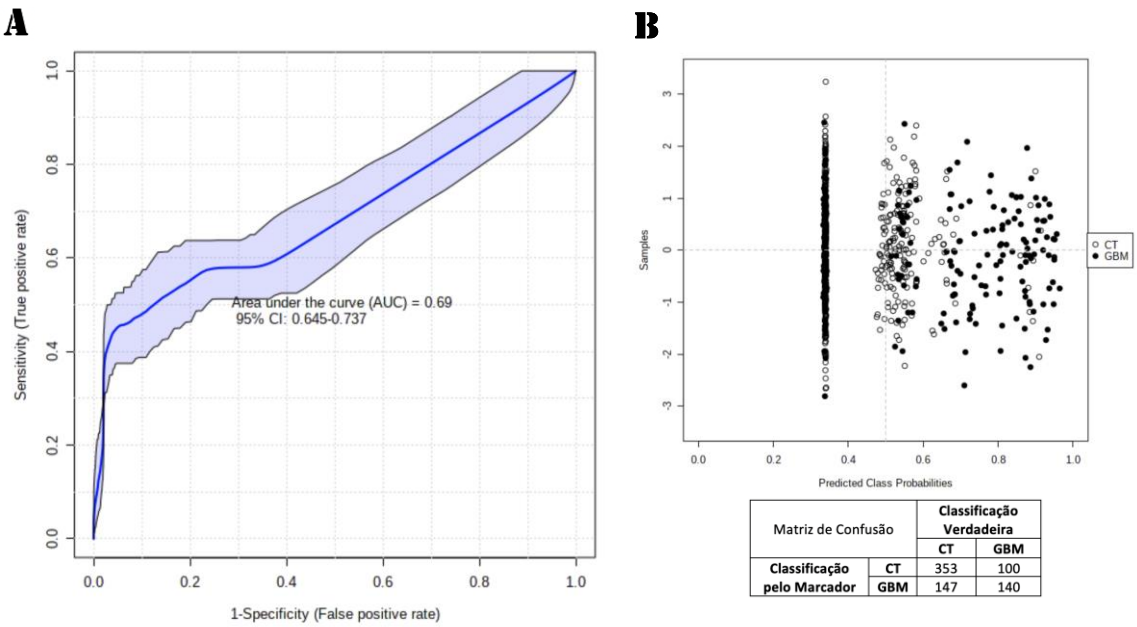


Figura 14 - Estrutura química de N-acilfosfatidiletanolamina
(fonte: https://www.lipidmaps.org/data/LMSDRecord.php?LMID=LMGP02010358)

A figura 15 apresenta a curva ROC para a N-acilfosfatidiletanolamina.



Matriz de Confusão		Classificação Verdadeira	
		CT	GBM
Classificação pelo Marcador	CT	353	100
	GBM	147	140

Figura 15 – Análise de acurácia do metabólito N-acilfosfatidiletanolamina como biomarcador de GBM. **A) curva ROC**, onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%; **B) Gráfico** demonstrativo das probabilidades das classificações previstas de cada replicata (n=10), os pontos pretos representam as replicatas das amostras de GBM e os pontos brancos representam as replicatas de cada CT, a linha pontilhada indica o limite da classificação (x = 0,5). A matriz de confusão é fornecida abaixo do gráfico.

A área sob a curva (AUC) foi calculada em 69%, a sensibilidade e especificidade de 58,3% e 70,6%, respectivamente. NAPE parece não representar um marcador acurado para discriminar GBM, como pode ser evidenciado pelo baixo valor de AUC, além de reduzidas sensibilidade e especificidade. Contudo, as análises de VIP, Log2FC e a caracterização dessa molécula, bem como as associações com outros tipos de câncer já discutidas anteriormente, reforçam a importância dessa molécula nas vias biológicas envolvidas com GBM.

PS (18:4) / (20:5) (1-estearidonoil-2-eicosapentaenoic-sn-glycero-3-fosfoserine)

Trata-se de um glicerofosfolipídio, com massa molar é 801,45 g/mol, também conhecido por fosfatidilserina (figura16).

Representa entre 3 e 15% dos fosfolipídios da membrana celular, desempenha papel estrutural importante para a sua estabilização. A distribuição da fosfatidilserina na membrana plasmática marca o início de processos fisiológicos importantes para a sobrevivência celular em mamíferos. Além de precursora para outros fosfolípideos, a fosfatidilserina é cofator que se liga e ativa várias proteínas, especialmente aquelas com atividades de sinalização (85 e 86).

A perda de assimetria de fosfolipídios da membrana plasmática indica o início da apoptose, caracterizado pela exposição de fosfatidilserina na superfície celular, indicando-as para fagocitose pelos macrófagos, antes que ocorra algum dano à membrana (87). Este processo tem relevância fundamental em oncologia, uma vez que a resistência à apoptose seja uma característica comum aos cânceres (88). Um aumento significativo nos níveis da fosfatidilserina indica instabilidade na homeostase tecidual pelo desequilíbrio entre a proliferação e morte celular, como ocorre nos tumores.

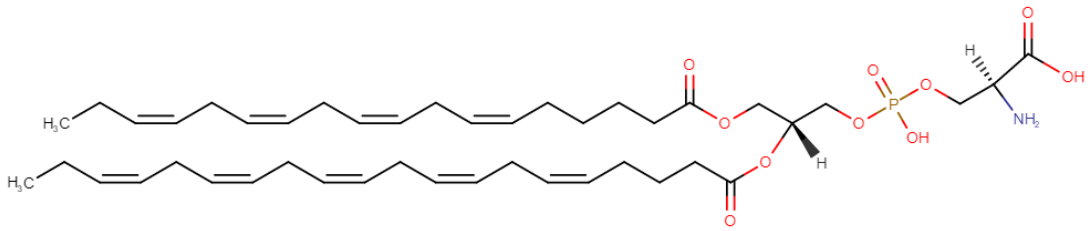
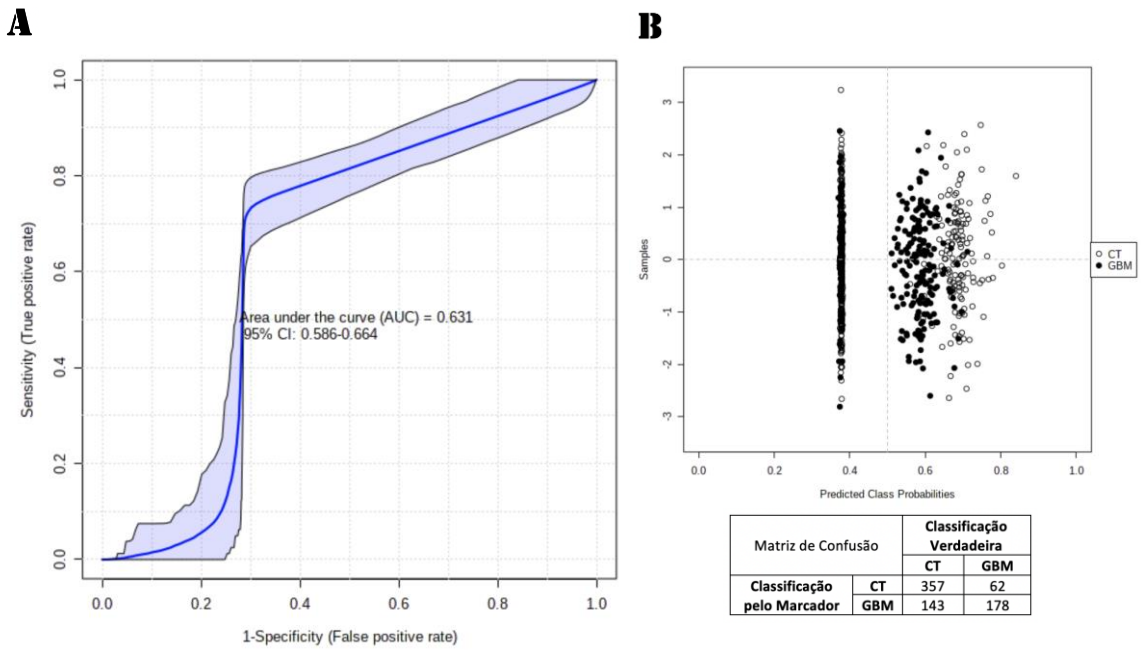


Figura 16 - Estrutura química de PS (18:4)/(20:5)

(fonte: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0112503)

A curva ROC construída para avaliar o modelo baseado na fosfatidilserina é apresentada na figura 17.



Matriz de Confusão		Classificação Verdadeira	
		CT	GBM
Classificação pelo Marcador	CT	357	62
	GBM	143	178

Figura 17 – Análise de acurácia do metabólito fosdatidilserina como biomarcador de GBM. **A) curva ROC**, onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%; **B) Gráfico** demonstrativo das probabilidades das classificações previstas de cada replicata (n=10), os pontos pretos representam as replicatas das amostras de GBM e os pontos brancos representam as replicatas de cada CT, a linha pontilhada indica o limite da classificação (x = 0,5). A matriz de confusão é fornecida abaixo do gráfico.

A área sob a curva (AUC) foi calculada em 63,1%, a sensibilidade e especificidade de 74,2% e 71,4%, respectivamente. A fosfatidilserina, sozinha, parece não representar um marcador acurado para discriminar GBM, como demonstrado pelo baixo valor de AUC, além de reduzidas sensibilidade e

especificidade. Entretanto, as análises anteriores (VIP, Log2FC), a caracterização dessa molécula e as associações no contexto biológico da oncologia, reforçam a importância dessa molécula nas vias biológicas envolvidas com GBM.

O-benzil-L-tirosina (O-Benzyl-L-Tyrosine)

Também nomeado de O4-benzil-DL-tirosina ou “H-DL-Tyr (Bn) -OH” pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), com massa molar 271,31 g/mol (89), trata-se de nitro aminoácido, gerado pela ligação de um radical benzil ao oxigênio, da hidroxila ligado ao anel benzênico da L-tirosina (figura 18).

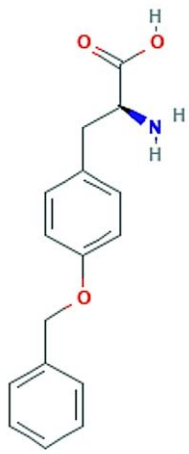


Figura 18 - Estrutura química de O-benzil-L-tirosina

(fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/725701)

Não foi encontrada associação entre câncer e este composto na literatura atual, revelando-o como um potencial marcador inédito de GBM. Esses resultados estimulam novos estudos para esclarecer a importância dessa molécula nas vias biológicas envolvidas com a doença.

Esse marcador possui a mesma relação massa/carga (m/z) do composto Arginil-Prolina, considerando o erro de 1 Dalton. Deste modo, a mesma curva

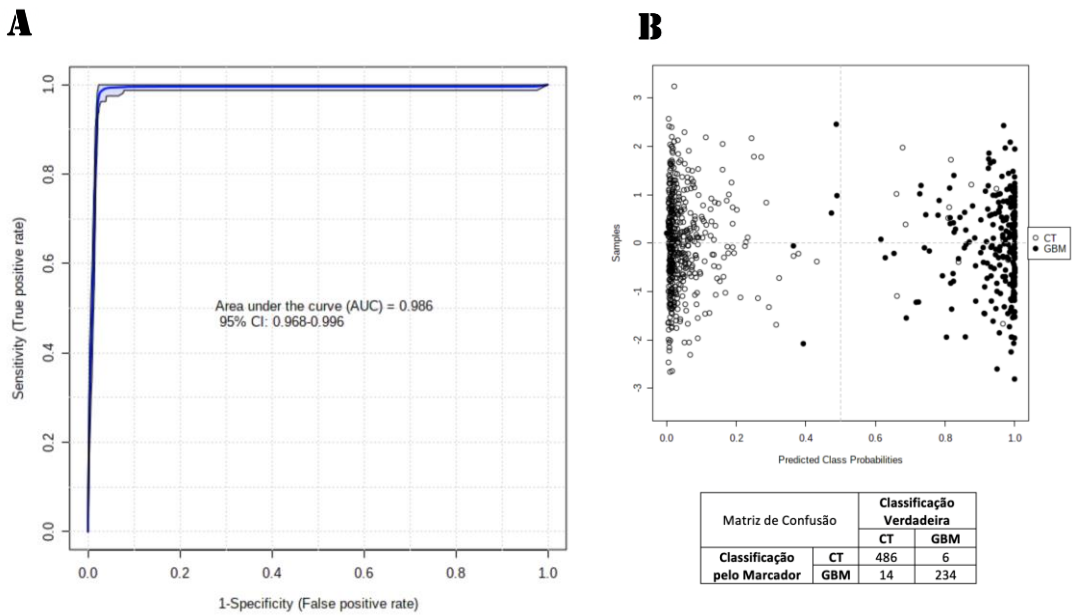
ROC deve ser considerada, uma vez que essa análise (curva ROC) é realizada considerando a massa do composto e não a sua estrutura.

Assim, a AUC foi calculada em 84,4%, a sensibilidade e especificidade de 62,1% e 95,8%, respectivamente, sugerindo que esse metabólito apresenta boa acurácia ao discriminar GBM dos controles, contudo, não deve ser utilizado individualmente com esse propósito.

Combinação de Metabólitos como Biomarcadores

Um dos principais propósitos dos estudos com enfoque na identificação de biomarcadores é o isolamento de uma molécula que, sozinha, poderia distinguir os indivíduos doentes dos saudáveis. Todavia, esse objetivo não é completamente atingido na maioria das vezes. Não obstante, a combinação de um biomarcador com outros parâmetros clínicos ou outros marcadores pode aumentar a acurácia do modelo e tornar viável o uso desse conjunto de informações em um potencial teste diagnóstico. Considerando esse contexto, verificamos qual seria a combinação dos metabólitos selecionados que apresentasse a melhor acurácia para indicar os indivíduos acometidos por GBM em um universo em que amostras de plasma sanguíneo congeladas fossem o analito a ser investigado.

Com vistas à redução dos custos em um provável teste diagnóstico laboratorial, foi selecionada a melhor combinação mínima de metabólitos que oferecesse a melhor acurácia. Foi suficiente a combinação de apenas dois metabólitos (5-hidroximetiluracil e piruvato) para indicar, com excelente acurácia (AUC = 98,6), os indivíduos acometidos por GBM, com uma sensibilidade e especificidade de 97,5% e 97,2%, respectivamente. A figura 19 mostra a curva ROC construída para esse modelo proposto.



Matriz de Confusão		Classificação Verdadeira	
		CT	GBM
Classificação pelo Marcador	CT	486	6
	GBM	14	234

Figura 19 – Análise de acurácia do conjunto de metabólitos (5-hidroximetiluracil e piruvato) como biomarcadores de GBM. **A) curva ROC**, onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%; **B) Gráfico** demonstrativo das probabilidades das classificações previstas de cada replicata (n=10), os pontos pretos representam as replicatas das amostras de GBM e os pontos brancos representam as replicatas de cada CT, a linha pontilhada indica o limite da classificação (x = 0,5). A matriz de confusão é fornecida abaixo do gráfico.

Considerações Finais

O uso da Espectrometria de Massas foi essencial para a obtenção do perfil dos metabólitos diferencialmente abundantes no plasma de pacientes acometidos pelo glioblastoma multiforme. A análise quimiométrica foi importante na identificação e caracterização dos metabólitos diferenciais e será útil na escolha dos metabólitos candidatos a marcadores plasmáticos de GBM.

Tais metabólitos são candidatos a potenciais marcadores plasmáticos de GBM, contudo, é necessária a validação futura desse conjunto de metabólitos em amostras de plasma sanguíneo em uma casuística mais ampla.

A caracterização dos metabólitos candidatos a marcadores propiciará um melhor conhecimento da biologia dos GBMs, essencial tanto para o

desenvolvimento de métodos diagnósticos e prognósticos quanto farmacológicos mais específicos de tratamento.

O presente estudo mostrou resultados inéditos quanto a associação de compostos que já haviam sido ligados a outros tipos de tumores, mas não em glioblastoma, bem como outros compostos que ainda não foram relatados alterados em qualquer tipo de câncer.

Ainda, a acurácia de todos os marcadores foi avaliada e, pelo menos cincos dos sete marcadores inicialmente selecionados apresentam poder de discriminação excelente (AUC > 80%) e são indicados para testes de validação em um número ampliado de amostras.

Conclusão

Os resultados obtidos mostraram que o plasma sanguíneo de pacientes acometidos por glioblastoma multiforme apresenta um perfil de metabólitos diferente dos indivíduos saudáveis. Foi possível selecionar potenciais marcadores diagnósticos de GBM e, após a caracterização dos metabólitos diferencialmente abundantes, será possível aprofundar os estudos para esclarecer quais vias moleculares estão envolvidas com a doença. Foi observada associação inédita entre os compostos identificados e o glioblastoma multiforme. Cinco dos sete metabólitos selecionados apresentaram-se como biomarcadores com alta acurácia na indicação de indivíduos acometidos por glioblastoma multiforme.

Aplicabilidade na prática profissional do produto gerado pela pesquisa

O presente estudo foi capaz de identificar metabólitos com alto potencial de aplicação como marcadores diagnósticos de glioblastoma multiforme. As próximas etapas compreendem a validação em uma casuística maior e testes para escolha da melhor forma de detecção. Ainda, os resultados globais sobre as vias biológicas encontradas alteradas em glioblastoma serão publicados em revista científica de relevante impacto científico e, preferencialmente, de acesso aberto. Desenvolver um teste diagnóstico menos invasivo, bem como disponibilizar informações inéditas a respeito da biologia da doença pode contribuir, de maneira efetiva, para melhorar o prognóstico da doença, tanto pela possibilidade de diagnosticar precocemente quanto por indicar novos potenciais alvos terapêuticos.

Referências

1 BRAY F., F. J. . S. I. . S. R. L. . T. L. A. . J. A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer J Clin.**, 4, Jul 2020. 313.

2 INCA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, p. 25-26. 2019.

3 JOAQUIM A.F., A. J. P. C. . G. E. . V. M. C. . T. H. Management of Patients with High Grade Gliomas. **J. Bras. Neurocirurg**, 1, Dec. 2014. 59 - 71.

4 LOUIS D.N., P. A. . R. G. . E. A. The 2016 World Health Organization - Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol.**, 6, 2016. 803-820.

5 LANTOS P.L., L. D. N. . R. M. K. . K. P. Tumours of the nervous system. **Greenfield´s Neuropathology.**, New York, 2002. 767-811.

6 OSTROM Q.T., G. H. . L. P. . V.-K. T. . W. Y. . K. C. . E. A. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. **Neuro Oncol.**, 5, 2017. 1-88.

7 NøRøXE D.S., P. H. S. . L. U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. **ESMO Open**, 6, Dec 2016.

8 MARK S., G. B. M. Thieme Medical Publishers. **Handbook of Neurosurgery**, 2016.

9 SANDER C., R. V. . E. C. . E. A. Familial glioblastoma clustering in adult patients: a case report of two non-twin siblings and review of the literature. **Int Med Case Rep J.**, 2019. 205-211.

10 SOUSA G., R. A. . A. T. . E. A. GLIOBLASTOMA MULTIFORME. com apresentação multifocal. **ACTA MÉDICA PORTUGUESA**, 2002. 321-324.

11 SHAW E.G., S. W. . S. C. . E. A. Reexamining the radiation therapy oncology group (RTOG) recursive partitioning analysis (RPA) for glioblastoma multiforme (GBM) patients. **International Journal of Radiation Oncology**, 2. 135-136.

12 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **World Cancer Report**. World Health Organization. Genebra. 2014.

13 MANFRO A.A.V., R. A. B. **Avaliação do envolvimento da proteína de choque térmico de 70-kD no crescimento de cultivos primários derivados de glioblastomas humanos**. UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL. Canoas. 2006.

14 PONTES L.B., K. T. . M. S. M. F. . E. A. Glioblastoma: enfoque no tratamento de pacientes idosos. **Revista Einstein**, 4, 2012. 512-518.

15 SASMITA A.O., W. Y. P. . L. A. P. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, 1, 2017. 40-51.

16 ESTELLER M., G.-F. J. . A. E. . G. S. N. . H. O. F. . V. V. . E. A. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. **N. Eng. J. Med.**, 19, 2000. 1350-1354.

17 MINNITI G., S. M. . A. A. . B. F. . D. A. . L. G. . E. A. Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in elderly patients with glioblastoma treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. **J Neurooncol.**, 2, 2011. 311-316.

18 SCHWARTZ M.K., E. A. **Cancer:** principles and practices of oncology. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1993. 531-542 p.

19 DE ALMEIDA J. R. C., E. A. Tumor Markers: a Literature Review. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 3, 2007. 305-316.

20 ROSA G.D., B. G. B. . C. G. F. . E. A. Marcadores tumorais em urologia. **Acta Médica**, Porto Alegre, 2005. 155-165.

21 ALMEIDA J.R.C. **Farmacêuticos em oncologia:** uma nova realidade. São Paulo: Atheneu, 2004. 61-72 p.

22 DOHERTY A.P., B. M. . C. T. J. The role of tumour markers in the diagnosis and treatment of testicular germ cell cancers. **Br J Urol**, 2, 1997. 247-252.

23 GUIMARÃES R.C., R. V. H. . P. C. A. J. . E. A. Uso dos marcadores tumorais na prática clínica. **Prática**, Belo Horizonte, 23, 2002. 1-8.

24 GOMES F.R. Marcadores tumorais (alcances e limites). **Acta Med Port**, 1, 1997. 75-80.

25 SHERMAN M. Surveillance for hepatocelular carcinoma. **Semin Oncol**, 5, 2001. 450-460.

26 KRISTEN L.G., B. K. **Urinary Markers for Bladder Cancer**. 26. ed. California: AUA Update Series., 2007. 326-35 p.

27 ARAÚJO J.H.G, P. J. V. **PRINCIPAIS MARCADORES TUMORAIS UTILIZADOS NA PRÁTICA CLÍNICA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**. UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA. João Pessoa. 2013.

28 PHILLIPS H.S., E. A. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis,delineate a pattern of disease progression, and resemble stagesin neurogenesis. **CANCER CELL**, 2006. 157–173.

29 COLMAN H., E. A. A multigene predictor of outcome in glioblastoma. **Neuro-Oncology**, 1, 2010. 49–57.

30 VERHAAK R.G.W., E. A. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. **Cancer Cell**, 1, 2010. 98-110.

31 CANUTO G.A.B., E. A. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Quím. Nova**, 1, 2018. 75-91.

32 NICHOLSON J.K., L. J. C. . H. E. Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, 11, 1999. 1181-1189.

33 O., F. Metabolomics — The link between genotypes and phenotypes. **Plant Mol. Biol.**, 2002. 155–171.

34 HUANG Q., T. Y. . Y. P. . E. A. Metabolic Characterization of Hepatocellular Carcinoma Using Nontargeted Tissue Metabolomics. **Cancer Res**, 16, 16 Aug 2013. 4992-5002.

35 DEJA S., P. I. . K. A. . E. A. Metabolomics provide new insights on lung cancer staging and discrimination from chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2014. 369-380.

36 CHEN F., X. J. . Z. L. . E. A. Identification of serum biomarkers of hepatocarcinoma through liquid chromatography/mass spectrometry-based metabonomic method. **Anal Bioanal Chem.**, 6, 2011. 1899–1904.

37 LOCASALE J.W., M. T. . S. S. . Y. X. . E. A. Metabolomics of Human Cerebrospinal Fluid Identifies Signatures of Malignant Glioma. **Molecular & Cellular Proteomics**, 6, 2012.

38 OERMANN E.K., W. J. . G. K.-L. E. A. Alterations of metabolic genes and metabolites in cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 4, 2012. 370-380.

39 YANG S., H. J. C. . L. M. E. . E. A. **Metabolomics in Practice**. [S.l.]: [s.n.], v. Wiley: Hoboken, 2013.

40 CANUTO G.A.B., D. C. J. L. . D. C. P. L. R. . E. A. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**, São Paulo, 41, Jan. 2018.

41 ALMSTETTER M.F., O. P. J. . D. K. Comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2012. 1993-2013.

42 CIEńSKA M., L. K. . L. M. . E. A. Effective L-Tyrosine Hydroxylation by Native and Immobilized Tyrosinase. **PLoS One**, 10, 2016.

43 ROBINSON M.D., S. G. K. . Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics**, 2, 2008. 321–332.

44 PACHOLEWSKA A. "Loget" - a Uniform Differential Expression Unit to Replace "logFC" and "log2FC". **Matters**, 2017.

45 XIA J., S. I. . H. B. . E. A. MetaboAnalyst 3.0 - making metabolomics more meaningful. **Nucl. Acids Res.**, 43, 2015. 251-257.

46 MARTINEZ E. Z., L.-N. F. . P. B. D. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, 11, 2003. 7-31.

47 HOSMER D.W., L. S. **Applied Logistic Regression**. 2. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2000. 156-164 p.

48 HMDB. 5-hidroximetiluracil (HMDB0000469), 2020. Disponivel em: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000469>. Acesso em: Outubro 2020.

49 PFAFFENEDER T., S. F. . W. M. . E. A. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. **Nat Chem Biol**, 7, Julho 2014. 574-581.

50 PAPALUCA A., W. J. R. . S. H. U. . E. A. UNG-1 and APN-1 are the major enzymes to efficiently repair 5-hydroxymethyluracil DNA lesions in C. elegans. **Sci Rep.** , 1, Maio 2018. 6860.

51 JACOBS A.L., S. P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. **Chromosoma**, 1, Fevereiro 2012. 1-20.

52 OLINSKI R., S. M. . G. D. Enigmatic 5-hydroxymethyluracil: Oxidatively modified base, epigenetic mark or both? **Rev Mutat Res**, Janeiro - Março 2016. 59-66.

53 DJURIC Z., H. L. K. . L. S. . E. A. Levels of 5-Hydroxymethyl-2’-deoxyuridine in DNA from Blood of Women Scheduled for Breast Biopsy. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 10, 2001. 147-149.

54 FRENKEL K., K. J. . G. T. . E. A. Serum autoantibodies recognizing 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, an oxidized DNA base, as biomarkers of cancer risk in women. **Cancer Epidemiol Biomark Prev.**, 7, 1998. 49-57.

55 COOKE M.S., E. M. D. . D. R. . E. A. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. **Mutat Res**, 1-2, Julho 2005. 58-66.

56 FOKSINSKI M., R. R. . G. J. . E. A. Urinary excretion of DNA repair products correlates with metabolic rates as well as with maximum life spans of different mammalian species. **Free Radic Biol Med**, 9, Novembro 2004. 1449-1454.

57 MARZZOCO A., T. B. B. . **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

58 SOGA T. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. **Cancer Sci.**, v. 104, n. 3, p. 275-281, 2013.

59 AMOÊDO N. D., V. J. P. . R. M. F. . E. A. How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells. **Biosci Rep**, v. 33, n. 6, 2013.

60 PHAN L.M., Y. S. C. . L. M. H. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. **Cancer Biol Med**, v. 11, n. 1, p. 1-19, 2014.

61 GALLUZZI L., K. O. . V. H. M. G. . E. A. Metabolic targets for cancer therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 11, p. 829-846, 2013.

62 JOHANNESSEN T.A., M. J. . V. P. . E. A. RaConversion of Mutant IDH1 from Driver to Passenger in a Model of Human Gliomagenesis. **Molecular Cancer Research**, 14, 2016. 976-983.

63 IKEDA A., N. S. . S. M. . E. A. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer. **Biomed Chromatogr**, v. 26, n. 5, p. 548-558, 2012.

64 GOEDERT J.J., S. J. N. . M. S. C. . E. A. Fecal metabolomics: assay performance and association with colorectal cancer. **Carcinogenesis**, 9, 2014. 2089-2096.

65 HMDB. 3-oxodecanoil-CoA (HMDB0003939). **HMDB**, 2020. Disponivel em: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0003939>. Acesso em: Outubro 2020.

66 KANT S., K. P. . P. A. . E. A. Enhanced fatty acid oxidation provides glioblastoma cells metabolic plasticity to accommodate to its dynamic nutrient microenvironment. **Cell Death & Disease**, 253, 2020. 1-13.

67 HMDB. 3-O-Sulfogalactosylceramide (d18:1/16:0) (HMDB0012313). **HMDB**, 2020. Disponivel em: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0012313>. Acesso em: Outubro 2020.

68 HOOPER N.M. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (Review). **Molecular Membrane Biology**, 16, 2009. 145-156.

69 ARTIGALÁS O.A.P., S. I. V. D. **Leucodistrofia Metacromática: Caracterização epidemiológica, bioquímica e clínica de pacientes brasileiros**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2009.

70 YODA Y., G. S. . M. A. . E. A. Glycolipids in human lung carcinoma of histologically different types. **Journal of the National Cancer Institute**, 5, Outubro 1979. 1153-1160.

71 HATTORI H., U. K. . T. T. Glycolipids of gastric cancer: The presence of blood group A-active glycolipids in cancer tissues from blood group O patients. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, 666, Dezembro 1981. 361-369.

72 KOBAYASHI T., H. K. . K. K. . E. A. Sulfolipids and glycolipid sulfotransferase activities in human renal cell carcinoma cells. **British Journal of Cancer**, Janeiro 1993. pages76–80.

73 GARCIA J., C. N. . B. L. P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells. **Glycobiology**, 2, Fevereiro 2007. 185-196.

74 SIMONIS D., S. M. . S. C. . E. A. Analysis of SM4 sulfatide as a P-selectin ligand using model membranes. **Biophysical Chemistry**, 150, Agosto 2010. 98-104.

75 LÄUBLI H., B. L. Selectins promote tumor metastasis. **Semin Cancer Biol**, 3, Junho 2010. 169-177.

76 FERBER S., T. G. . S.-H. A. . E. A. Co-targeting the tumor endothelium and P-selectin-expressing glioblastoma cells leads to a remarkable therapeutic outcome. **Cancer Biology**, Outubro 2017. 1-34.

77 DE FONSECA F.R., N. M. . G. R. . An anorexic lipid mediator regulated by feeding. **Nature**, Novembro 2001. 209–212.

78 WANG J., U. N. Biology of endocannabinoid synthesis system. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, 89, 2009. 112-119.

79 CONTASSOT E., W. R. . T. M. . E. A. Arachidonylethanolamide induces apoptosis of human glioma cells through vanilloid receptor-1. **J Neuropathol Exp Neurol**, 9, Setembro 2004. 956-963.

80 WU X., H. L. . Z. X. . Alteration of endocannabinoid system in human gliomas. **J Neurochem**, 5, Março 2012. 842-849.

81 PATEL D., W. S. N. Ethanolamine and Phosphatidylethanolamine: Partners in Health and Disease. **Oxid Med Cell Longev.**, 2017.

82 WIDER, M. C. Pesquisador fala sobre biologia redox e morte celular por ferroptose em Seminário do Redoxoma. **Redoxoma**, 2018. Disponivel em: <http://redoxoma.iq.usp.br/paginas_view.php?idPagina=882#.X7WbtWhKjIV>. Acesso em: Outubro 2020.

83 OKAMOTO Y., M. J. . T. K. . E. A. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. **J Biol Chem**, 7, Fevereiro 2004. 5298-5305.

84 MASOODI M., L. E. . E. M. . E. A. A role for oleoylethanolamide in chronic lymphocytic leukemia, 7, Julho 2014. 1381-1387.

85 KAY J.G., G. S. Phosphatidylserine-mediated cellular signaling. **Adv Exp Med Biol**, 2013. 177-193.

86 VANCE J.E., S. R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. **Progress in Lipid Research**, 44, 2005. 207-234.

87 VAN ENGELAND M., N. L. J. . R. F. C. . E. A. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, 31, 1998. 1-9.

88 GADIYAR V., L. K. C. . C. D. . E. A. Cell Death in the Tumor Microenvironment: Implications for Cancer Immunotherapy. **Cells**, 2020. 2207.

89 PUBCHEM. 2-Amino-3-[4-(benzyloxy)phenyl]propanoic acid. **PubChem**. Disponivel em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86047>. Acesso em: Setembro 2020.

90 HEGI M.E., D. A. C. . G. T. . H. M. F. . D. T. N. . W. M. . E. A. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N. Eng. J. Med.**, 10, 2005. 997-1003.

91 OHGAKI H., K. P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. **Am. J. Pathol.**, 2007. 1445–1453.

92 SZERLIP N.J., P. A. . C. D. . A. M. . E. A. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2012.

93 EDER K., K. B. Molecular heterogeneity of glioblastoma and its clinical relevance. **Pathol Oncol Res.**, 4, 2014. 777-787.

94 OHGAKI H., K. P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clin Cancer Res**, 4, 2013. 764-772.

95 ESTUDOS TEM EVIDENCIADO A HETEROGENEIDADE MOLECULAR DOS GBM (PHILLIPS ET AL., 2. **As subclasses moleculares de glioma de alto grau predizem o prognóstico,delinear um padrão de progressão da doença e assemelhar-se a estágiosna neurogênese**. [S.l.].

96 ESCOBAR M.Q., D. S. M. G. **Transcriptômica e metabolômica como ferramentas para o entendimento do processo de adaptação metabólica tumoral dos tumores de mama triplo-negativo**. UNICAMP. Campinas. 2016.

97 M.K., S. **Cancer:** principles and practices of oncology. 4. ed. Philadelphia: [s.n.], 1993. 531-542 p.

98 WEN P., K. S. Malignant Gliomas in Adults. **NEJM**, 2008. 492–507.

99 FURNARI F.B., E. A. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev**, 2007. 2683–2710.

100 LOUIS D.N., P. A. . R. G. . E. A. The 2016 World Health Organization - Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol.**, 6, 2016. 803-820.

101 BLIGH E.G., D. W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, n. 8, p. 911-917, Aug 1959.

102 MELO C.F.O.R., E. A. Serum Metabolic Alterations upon Zika Infection. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1954, 2017.

103 N.M., H. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (Review). **Molecular Membrane Biology**, 16, 2009. 145-156.

104 GHOSH S., S. J. C. . B. R. M. Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. **The Faseb Journal**, 11, 1997. 45-50.

105 DIVECHA N., I. R. F. Phospholipid Signaling. **Cell**, 80, 1995. 269-278.

106 D., W. A. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. **J Lipid Res**, 10, 2006. 2101-2011.

107 C.L.S.L.C., O. **IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF GANGLIOSIDES IN BRAIN OF MOUSE MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE: A LIPIDOMIC STUDY.** Universidade de Aveiro. [S.l.]. 2016.

108 FAURE L., C. K. D. N-Acylphosphatidylethanolamines (NAPEs), N-acylethanolamines (NAEs) and Other Acylamides: Metabolism, Occurrence and Functions in Plants. **AOCS Lipid Library**, 2020. Disponivel em: <https://lipidlibrary.aocs.org/chemistry/physics/plant-lipid/n-acylphosphatidylethanolamines-(napes)-n-acylethanolamines-(naes)-and-other-acylamides-metabolism-occurrence-and-functions-in-plants>. Acesso em: Setembro 2020.

109 CUNNINGHAM M.W. JR., W. J. M. . A. L. . E. A. Agonistic Autoantibodies to the Angiotensin II Type 1 Receptor Enhance Angiotensin II – Induced Renal Vascular Sensitivity e Reduce Renal Function during Pregnancy. **Hypertension**, 5, 2016. 1308–1313.

110 LI B., L. Y. Y. . W. H. M. . E. A. Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N2 fixation. **PNAS**, 23, 2016. 6496–6501.

111 TUSHER, V. G. . T. R. . C. G. . Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **PNAS**, 9, 2001. 5116–5121.

112 LOVE M.I., H. W. . A. S. . Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, 15, n. 12, 2014. 550.