

Maria José Ferreira Alves

Glutaminólise em astrocitomas

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

Programa de Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alves, Maria José Ferreira

Glutaminólise em astrocitomas / Maria José Ferreira Alves. -- São Paulo,
2014.

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

Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.Glutamina 2.Sistemas de transporte de aminoácidos neutros
3.Glutaminase 4.Astrocitoma 5.Expressão gênica 6.Reação em cadeia da
polimerase em tempo real 7.Biologia molecular

USP/FM/DBD-141/14

Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.

Isaac Newton

Agradecimentos

À Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie, minha orientadora, que possibilitou a oportunidade de enriquecer meus conhecimentos desenvolvendo este trabalho tão importante em minha vida acadêmica, pelos ensinamentos, por permitir trabalhar em seu laboratório, pela oportunidade que tem me dado, pelas lições de vida que tenho aprendido, pela educação recebida, enfim, pelo seu carinho e por tudo. Inúmeros adjetivos seriam insuficientes para demonstrar minha gratidão. Muito obrigada.

À Dra. Sueli Mieko Oba Shinjo, pelo sim tanto na entrevista onde tudo começou quanto na monografia, pelo carinho e pela simplicidade, por todo seu apoio para meu crescimento profissional, com você não só aprendi técnicas e ensinamentos científicos, mas, lições para toda vida. Obrigada.

Ao Dr. Hélio Rodrigues e ao Dr. José Antônio Livramento, chefes do Laboratório de investigação Médica LIM-15, onde este trabalho foi desenvolvido. Obrigada.

À Dra. Miyuki Uno, coordenadora do Biobanco Processamento do Centro Translacional em Oncologia – CTO – ICESP, por todo apoio e ensinamentos, por toda ajuda nos cálculos estatístico, pelo incentivo em buscas de aulas de bioquímica para auxiliar nesta dissertação, pela sua dedicação à pesquisa em câncer, pela amizade inestimável e pelo carinho. Muito obrigada.

À minha querida amiga Dra. Roseli da Silva, pesquisadora científica do Laboratório de Investigação Médica, LIM15 pelos ensinamentos, pelo incentivo,

pelo carinho, por todo apoio que recebi desde meu primeiro dia no laboratório e pela nossa preciosa amizade. Obrigada.

À Thais Figueira, Secretária da Pós-Graduação, por todo apoio e orientações sempre que necessário. Obrigada.

Ao Dr. Samuel Katsuyuki Shinjo, médico Reumatologista do Hospital das Clínicas da FMUSP, por estar cuidando do meu Pai e sem dúvidas por ter devolvido qualidade de vida a ele, pois o meu Pai estava com a mobilidade comprometida e hoje continua trabalhando e com sua vida “normal”, obrigada também pelo apoio quando me tornei sua paciente e pela sua forma descontraída de ser, Dr. Samuel o senhor é exemplo de vida! Obrigada.

Ao Dr. Ulysses Ribeiro Jr., Chefe do Centro Cirúrgico do ICESP, por ter nós recepcionado tão bem, e pela ajuda nas coletas para formação do Biorrepositório. Muito obrigada.

Ao Dr. Guilherme Lepski, Neurocirurgião do ICESP, pelo ensinamento da técnica de laminectomia e pela sua dedicação a profissão e a ciência.

Ao Dr. Flávio Key Miura, Neurocirurgião do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelo ensinamento da técnica de estereotaxia, pelo seu exemplo de amor à profissão, e pela dedicação a ciência.

A toda equipe da patologia do ICESP, coordenada pelo Dr. Evandro Sobroza de Mello, pelo apoio na implantação do Biobanco.

À Dra. Fernanda Andrade, Neurocirurgião do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelo carinho, amizade, pelos livros de inglês os quais proporcionam meu aprendizado, pelo seu exemplo de disciplina, e de que tudo é possível, Fernandinha obrigada por tudo.

Ao Dr. Carlos Afonso Clara, Neurocirurgião do Hospital do Câncer de Barretos, pela sua amizade e carinho, pelo seu exemplo de humildade.

À Célia Kazuko Miyagui, secretária executiva do Biobanco Processamentos, que mesmo sem me conhecer vibrou junto comigo no dia que fui contemplada com o FIES em 2004, nesse dia eu recebi o passaporte para continuar no laboratório e cursar a Faculdade. Foi onde surgiu uma amizade e cuidado de Mãe para comigo... Celinha obrigada pelo carinho, pela ajuda sempre que preciso, você é muito especial!

À D. Joana Neci Cardoso da Silva, mãe da Roseli pela amizade e carinho. Obrigada.

Ao meu amigo Dr. Carlos Alberto Soares, pela sua amizade, por toda ajuda como excelente advogado que é!

À Mussya Cisotto Rocha, pela nossa amizade, por seu incentivo, pela sua maravilhosa companhia, Mussya foi um prazer ter trabalhado com você. Obrigada pelo apoio e por sua torcida.

À Gisele Nunes Reis, pelo seu carinho, amizade e sua forma mineirinha engraçada de ser.

À Thaís Fernanda Galatro, pelo seu carinho, amizade e pela realização da imuno-histiquímica. Muito obrigada.

À Paula Sola, pelo carinho, amizade e pela ajuda nos desenhos e otimização dos últimos *primes*. Muito obrigada.

À Cínthia Ellim James, pelo ensinamento da técnica de imunofluorescência, pelo carinho e amizade.

À minha querida amiga Priscila Carvalho, pelo carinho e amizade!

À minha querida amiga Simone Kneip Cavalheiro, pelo seu exemplo de luta e força!

À Minha amiga Ana Lúcia Garippo, do Instituto do Coração (INCOR), responsável pela microscopia confocal, pelos ensinamentos para melhoria das imunocitoquímica, pelos conselhos e pela sua grandiosa e sincera amizade. Obrigada.

À Dra. Fernanda Pozzi, Professora de bioquímica, por permitir assistir suas maravilhosas aulas, as quais ajudaram aprimorar meus conhecimentos. Muito obrigada.

A todos que Fazem parte do Centro Translacional em Oncologia – CTO (ICESP), onde trabalho e as minhas companheiras do Biobanco Processamento: Denise Raquel Cappi, Daniela Alves Cordeiro, Flávia da Silva Cruz e Michele Tatiane Tomitao.

A todos que fazem parte do LIM-15, Thaís Freire, Darcy Terezinha Borges, Camila Caroline de Sena, Márcia Azevedo, Mônica de Souza, Maria Eunice, Luiz Roberto Silva, Eliene Dutra Campos, Rosa Line Viana, Laís, Osmar JR., D. Alice, Erika Matsunaga e Hirome Matsunaga e a todos aqueles que torceram por mim e deram apoio em todo em toda minha jornada.

À Olinda, minha fada madrinha, sem a qual eu não estaria onde estou.

À minha irmã Célia Ferreira Alves, pelo apoio quando precisei e pela ajuda na escolha do curso de Biologia.

Ao meu querido irmão Edilson, pela carona de todos os dias, pela ajuda financeira quando precisei, e pelo carinho.

À minha irmã Elisabete, pela ajuda financeira, pelo carinho, e ao seu esposo Paulo Sérgio Cassin pelo carinho e incentivo recebido, e aos meus sobrinhos Gicélia Alves dos Santos e Gilvan Alves dos Santos.

À Renata Ferreira Alves, minha sobrinha pelo carinho e incentivo, ao Seu esposo Walmir Senna e ao meu sobrinho Watson.

À Maria de Lourdes da Silva, por ter me acolhido em sua casa, por todo apoio, carinho e pela sua forma descontraída de ser. Obrigada.

Ao meu sobrinho Daniel Alves por estar sempre disposto a ajudar sempre que preciso.

As minhas companheiras do Lar: Rita Nuñez Martinez por todo amor, carinho, companheirismo, por sempre estar do meu lado em todos os momentos, por ajudar no entendimento do idioma e da cultura espanhola. À Teva Maria Vidal Oliveira por seu apoio, carinho e pela paciência. À Jailda Oliveira de Souza, pelas massagens terapêuticas, acupunturas, pelos conselhos, amizade e ao seu filho Flávio Volverine, por seu carinho!

À minha família por todo apoio, carinho, compreensão e amor!

E a todos aqueles que por um momento de falha esqueci, mas, que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

Aos pacientes com tumores cerebrais, que com seu sofrimento incentiva a busca pela cura.

A Deus, por ter me guiado nos momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Glutamina	4
2.1.1. Transportadores de glutamina através da membrana plasmática	6
2.1.2. Glutaminólise	12
2.1.3. Glutaminase	13
2.1.4. Conversão do glutamato a α -cetoglutarato	16
2.2. Glutaminólise e astrocitomas	18
2.3. Tumores do sistema nervoso central	19
2.3.1. Astrocitoma pilocítico (grau I)	21
2.3.2. Astrocitoma difuso ou de baixo grau (grau II)	22
2.3.3. Astrocitoma anaplásico (grau III)	23
2.3.4. Glioblastoma (grau IV)	24
3. Objetivos	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26

4. Casuística & Metodologia	27
4.1. Casuística	27
4.2. Metodologia	28
4.2.1. Extração de RNA total	28
4.2.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa	29
4.2.3. Análise dos resultados de expressão gênica por microarray de oligonucleotídeos e seleção de genes	29
4.2.4. Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	30
4.3. Análise estatística	34
5. Resultados	35
5.1. Seleção dos genes a partir dos dados de microarray de oligonucleotídeos	35
5.2. Validação da expressão gênica dos alvos selecionados em casuística ampliada	37
5.2.1. Transportadores da glutamina	37
5.2.2. Conversão de Gln a Glu	39
5.2.3. Conversão de Glu a α -cetogluturato	42
5.3. Correlações dos níveis das expressões dos genes estudados	46
5.4. Análise de sobrevida – Kaplan Meier	51
6. Discussão	53
6.1. Transportadores da glutamina	54
6.2. Conversão da glutamina a glutamato	56

6.3. Conversão do glutamato a α -cetoglutarato	59
7. Conclusão	63
8. Referência bibliográfica	65
9. Anexos	85

Lista de abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
°C	Grau Celsius
CAT	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou do ácido cítrico
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CBTRUS	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfatados
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GOT	Glutamato oxaloacetato transaminase
GPT	Glutamato piruvato transaminase
Gln	Glutamina

Gls	Glutaminase
GLUD1	Glutamato desidrogenase 1
Glu	Glutamato
GBM	Glioblastoma
GUS-Beta	Beta-glucoronidase gene
GSH	Glutathiona
HC	Hospital das clínicas
HeLa	Henrietta Lacks (Células HeLa)
HE	Hematoxilina e eosina
HIF	Fator induzido de transcrição induzido pela hipóxia
HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene
IDH1	Isocitrato desidrogenase 1
KCl	Cloreto de sódio
kDa	Kilodalton
LIM15	Laboratório de Investigação Médica 15
ME	Enzima málica
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

MYC	<i>Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
mM	Milimolar
Mol	Quantidade de matéria
Min.	Minuto
OMS	Organização mundial da saúde
OAA	Oxaloacetato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
pb	Pares de bases
p	Probabilidade
PCR	Reação em cadeia polimerase
pH	Potencial hidrogênico
q	Braço longo do cromossomo
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
r	Coefficiente de correlação
RNA	Ácido ribonucléico
s	Segundo
SNC	Sistema nervoso central
TAE	Tris-acetato EDTA

TBP TATA box proteína de ligação

TE Tris-EDTA

TP53 Tumor protein p53 gene

μL Microlitro

μM Micromolar

$\alpha\text{-KG}$ Alfa cetogluturato

Lista de Figuras

Figura 1.	Via mostrada à glicose e a glutamina como fornecedor de carbono e nitrogênio.	5
Figura 2.	Esquema mostrando o balanço entre ASCT2 e LAT1	11
Figura 3.	Esquema mostrando a via da glutaminólise	12
Figura 4.	Gráfico mostrando a distribuição dos gliomas	20
Figura 5.	Vias de alterações genéticas envolvidas na progressão na dos astrocitomas.	25
Figura 6.	Exemplo de curva de dissociação e curva padrão dos genes e eletroforese em Gel de agarose dos genes estudados.	33
Figura 7.	Gráfico de dispersão da fluorescência obtido nos experimentos de microarray dos genes envolvidos na glutaminólise selecionados após validação <i>in silico</i>	36
Figura 8.	Gráficos de dispersão representando a expressão de <i>ASCT2</i> e <i>LAT1</i> em astrocitomas de diferentes graus e tecidos não neoplásicos.	39
Figura 9.	Gráficos de dispersão representando a expressão de <i>GLS</i> , <i>GLS2</i> , <i>GLS ISO1</i> e <i>GLS ISO2</i> em astrocitomas de diferentes graus e tecidos não neoplásicos.	41
Figura 10.	Gráficos de dispersão representando a expressão de <i>GLUD1</i> em astrocitomas de diferentes graus e tecidos não	43

neoplásicos.

- Figura 11. Gráficos de dispersão representando a expressão de *GOT1* e *GOT2* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos não neoplásicos. 44
- Figura 12. Gráficos de dispersão representando a expressão de *GPT2* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos não neoplásicos. 45
- Figura 13. Heatmap mostrando os dados de correlações dos genes da glutaminólise analisado em AGI, AGII, AGIII e GBM 47
- Figura 14. Heatmap mostrando a expressão dos genes da glutaminólise em NN, AGI, AGII, AGIII e GBM. 50
- Figura 15. Curva de sobrevivência de pacientes com GBM (AGIV), comparando os grupos em relação à expressão de *ASCT2* em A e *LAT1* em B hipoexpressos versus hiperexpresso e em C as combinações de *LAT1* hipo e hiper na presença de *ASCT2* hipo. 52
- Figura 16. Visão geral dos níveis de expressão de RNAm de *GLS* e *GLS2* em astrocitomas de diferentes graus e tecido não neoplásico. 57
- Figura 17. Visão geral dos níveis de expressão de RNAm de *GLS ISO1* e *GLS ISO2*, em astrocitomas de diferentes graus e tecido não neoplásico. 58

Figura 18. Visão geral dos níveis de expressão de RNAm de *GOT1* e *GOT2* em astrocitomas de diferentes graus e tecido não neoplásico. 61

Figura 19. Via mostrando o oncogene *KRAS* reprogramando o metabolismo da Gln para manutenção e crescimento tumoral. 62

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Tipo de transportadores de aminoácidos.	7
Tabela 2.	Tipo de glutaminases	13
Tabela 3.	Classificação dos astrocitomas, segundo a Organização Mundial de Saúde.	21
Tabela 4.	Sequência e concentração dos primers.	32
Tabela 5.	Enzimas e os transportadores com a sigla oficial dos genes da via da glutaminólise.	35

Resumo

Alves MJF, Glutaminólise em astrocitomas [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O metabolismo da glutamina (Gln) é alvo de atenções recentes para a compreensão da reprogramação metabólica para o suprimento energético das células tumorais em proliferação e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em câncer. Tanto a absorção de glutamina quanto a taxa de glutaminólise, o catabolismo da Gln para gerar adenosina trifosfato (ATP) e lactato na mitocôndria estão aumentados em diferentes tumores. A Gln e glicose participam do processo da proliferação de células tumorais tanto na produção de (ATP) como no fornecimento de produtos intermediários utilizados na síntese de macromoléculas e Gln é utilizado para anaplerose do ciclo do ácido tricarboxílico. Nesse estudo, nosso objetivo foi analisar a expressão dos genes envolvidos na glutaminólise: *ASCT2*, *LAT1*, *GLS*, *GLSISO1*, *GLSISO2*, *GLS2*, *GOT1*, *GOT2*, *GLUD1* e *GPT2* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade (AGI-AGIV), classificados de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em relação às expressões em tecidos cerebrais não neoplásicos e correlacionar os níveis de expressão destes genes aos dados clínicos. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi realizado em 175 amostras, sendo 22 dentre estes de tecidos não neoplásicos. Observou-se tempo de sobrevida menor entre os pacientes com hiperexpressão de *LAT1*, na presença de hipoexpressão de *ASCT2*. A expressão de *GLS* foi comparativamente maior que a expressão de *GLS2* entre os astrocitomas de diferentes graus de malignidade, corroborando descrições prévias de que *GLS* relaciona-se à proliferação tumoral e *GLS2* à supressão do crescimento tumoral. Observou-se, adicionalmente, o aumento da associação das expressões destes genes conforme o aumento do grau de malignidade, culminando em GBM, onde estas correlações foram estatisticamente significativas. Apesar da demonstração da ativação gradativa desta via da glutaminólise com o aumento da malignidade, a hiperexpressão dos genes relacionados a esta via mostrou-se hiperexpressa em apenas um subgrupo de pacientes com GBM. Esta observação ressalta a heterogeneidade observada em GBM e a elegibilidade restrita deste subgrupo a eventuais estratégias terapêuticas que forem desenvolvidas com alvos nesta via.

Descritores: Glutamina; Sistemas de transporte de aminoácidos neutros; Glutaminase; Astrocitoma; Expressão gênica; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Biologia molecular.

Summary

Alves MJF. Glutaminolysis in astrocytomas [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

The metabolism of glutamine (Gln) is the target of recent attentions to understand the metabolic reprogramming of cancer cell for the energetic needs for cell proliferation, and to develop new cancer therapeutic strategies. Glutamine absorption and glutamine conversion to ATP and lactate in the mitochondria through glutaminolysis are both increased in different cancer types. Gln and glucose participate in metabolic pathways which provide ATP and intermediate substrats for synthesis of macromolecules, and Gln is used for anaplesoris of tricyclic acid cycle. The aims of the present study were to analyze the differential mRNA expressions of genes involved in the glutaminolysis pathways: *ASCT2*, *LAT1*, *GLS*, *GLSISO1*, *GLSISO2*, *GLS2*, *GOT1*, *GOT2*, *GLUD1* e *GPT2* in astrocytomas of different grades of malignancy (WHO grades I to IV) compared to non-neoplastic brain tissues, and to correlate these expression data to clinical outcome. Shorter overall survival time was observed among a subset of GBM patients presenting hyperexpression of *LAT1* while *ASCT2* was hypoexpressed. *GLS* expression was comparatively higher than *GLS2* expression among astrocytomas of different grades of malignancy, which corroborates previous reports relating *GLS* to tumor proliferation and *GLS2* to suppression of tumor growth. Additionally, increased gene expression correlation was observed in parallel to the increase of malignancy, and these associated expressions were significant among GBM. Although a stepwise increase of the glutaminolysis pathway was demonstrated with the increase of malignancy in astrocytomas, the hyperexpression of genes involved in this pathway were detected only in a subset of GBM patients. This finding confirm the heterogeneity observed among GBM, and highlights the fact that any therapeutic strategy aiming this pathway will be restricted to a subset of GBM patients.

Descriptors: Glutamine; Amino acid transport systems, neutral; Glutaminase; Astrocytoma; Gene expression; Real-time polymerase chain reaction; Molecular biology.

1. Introdução

O metabolismo de tumores tem sido bem estudado em câncer desde os experimentos de Otto Warburg, quando foram demonstradas elevadas taxas de glicose e secreção de lactato mesmo na presença de oxigênio (o efeito Warburg) em células tumorais de ascite de camundongos. Como este comportamento foi diferente quando comparado ao dos tecidos diferenciados, estas primeiras observações foram importantes para se pensar que as idiosincrasias metabólicas dos tumores poderiam ser exploradas para beneficiar os pacientes com câncer (Warburg, 1925, Warburg, 1956).

A demonstração de várias mutações nos genes que codificam as proteínas envolvidas no metabolismo aumentou o interesse pelo efeito Warburg no tratamento do câncer, sugerindo um impacto no processo essencial para o crescimento do tumor (Elstrom et al., 2004; Flier et al., 1987; Kroemer e Pouyssegur, 2008; Matoba et al., 2006; Osthus et al., 2000; Shim et al., 1997).

O metabolismo da glutamina (Gln) está sujeita a uma reprogramação no desenvolvimento do câncer. Tanto a absorção de Gln como a taxa de glutaminólise (ou seja, o catabolismo da Gln para gerar adenosina trifosfato (ATP) e lactato na mitocôndria) estão aumentadas em tumores. No metabolismo da Gln, glutaminase mitocondrial (GLS) é uma enzima central na conversão de Gln em glutamato (Glu). O Glu participa na regulação da bioenergética mitocondrial em muitas células normais e cancerosas, através do ciclo de ácido tricarboxílico (CAT). (Suzuki et al., 2010).

Kovacevic e colaboradores (1983) abordaram o metabolismo da Gln, em associação ao efeito Warburg, contribuindo para o entendimento do fenótipo metabólico da proliferação celular. A Gln e glicose participam do processo da proliferação de células tumorais tanto na produção de (ATP) como no fornecimento de produtos intermediários utilizados na síntese de macromoléculas (DeBerardinis et al., 2008). Há mais de vinte e cinco anos, os estudos mostram que a Gln e não apenas a glicose é um importante substrato para o crescimento e proliferação de células HeLa em cultura (Reitzer et al., 1979). No entanto, só recentemente tem sido relatado que oncogene como *MYC* influencia no metabolismo da Gln de maneira similar à influência no metabolismo da glicose, e que alterações gênicas podem determinar dependência a Gln das células tumorais para a sobrevivência. Além disso, outros estudos em mamíferos têm relatado a participação da Gln e de seus subprodutos na sinalização do processo de crescimento celular através da via principal de estímulo por aminoácidos essenciais que apresentam como alvo a rapamicina (mTOR) (DeBerardinis et al., 2010). Adicionalmente, inúmeras evidências sugerem que Gln modula a resposta imune. O pré-tratamento com Gln de animais submetidos a estresse oxidativo induzido por radiação diminuiu a inflamação tecidual mediada por NF- κ B, sugerindo que Gln tenha tamponado o efeito oxidoreductor (Erbil et al., 2005).

As evidências cumulativas confirmam que Gln faz parte do core de todo o metabolismo das células tumorais em proliferação, participando na bioenergética, na defesa celular contra o stress oxidativo, na complementação do metabolismo de glicose com a produção de macromoléculas e influenciando as vias de sinalização do crescimento tumoral. Portanto, o esforço aplicado no

entendimento da regulação do metabolismo da Gln objetivando o desenvolvimento de estratégias de novos tratamentos com alvo no seu metabolismo se justifica.

Os gliomas são originários de células gliais ou precursores da glia, através de alterações genéticas que promovem a transformação e a progressão maligna (Fomchenko et al., 2005). Os gliomas malignos exibem alta taxa de proliferação, migração e invasão (DeAngelis et al., 2001 e Bello et al., 2004). De acordo com o CBTRUS 2012, os gliomas representam 29% de todos os tumores e 80% dos tumores malignos, sendo que os astrocitomas representam 76% de todos os gliomas.

Assim o entendimento molecular dos mecanismos que regulam o crescimento celular de gliomas é muito importante, pois esse entendimento poderá leva a descoberta de novos alvos terapêuticos.

Dentro deste contexto, o presente estudo tem como proposta a análise da expressão dos genes envolvidos no metabolismo da Gln em astrocitomas e a correlação destes resultados com os graus de malignidade.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Glutamina

A Gln é o aminoácido mais abundante no corpo e especialmente abundante no fígado, rim, músculo esquelético e cérebro (Mohamed et al 2014), sendo o principal transportador de nitrogênio e carbono em células de mamíferos, Figura 1. A Gln é sintetizada no músculo esquelético, nos pulmões, e no tecido adiposo e compreende mais de 60% dos aminoácidos livres disponíveis no organismo. A Gln é utilizada por todas as células para a síntese de purinas: adenina (A) e guanina (G); pirimidinas: citosina (C) e timina (T); glucosamina e outros aminoácidos (Curthoys et al., 1995).

Embora a Gln seja classificada como aminoácido não essencial em indivíduos saudáveis, ela é “semi-essencial” na alimentação enteral ou parenteral de pacientes criticamente enfermos (Lacey e Wilmore, 1990) e essenciais para o crescimento de células em cultura, tanto normais quanto malignas (Eagle et al., 1956; Kovacevic e Morris, 1972; Reitzer et al., 1979; Turner e McGivan, 2003). As células tumorais em cultura são ávidas consumidoras de Gln, metabolizam Gln em taxa muito superior a quaisquer outros aminoácidos (Eagle, 1955). A Gln está envolvida em vários processos metabólicos entre eles a homeostase ácido-base, gliconeogênese, transporte de nitrogênio e síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Newsholme et al.,

1986, Boza et al., 2000). É uma importante fonte de energia para muitos tipos de células, especialmente aquelas que estão se dividindo ativamente, como, por exemplo, células epiteliais do intestino delgado e grosso (enterócitos) ou células do sistema imune (timócitos, linfócitos e macrófagos) (Brand, 1985; Curthoys et al., 1995; Curi et al., 1999). O feto, folículo piloso e muitos tumores, apresentam taxas elevadas de utilização da Gln (Curthoys et al., 1995).

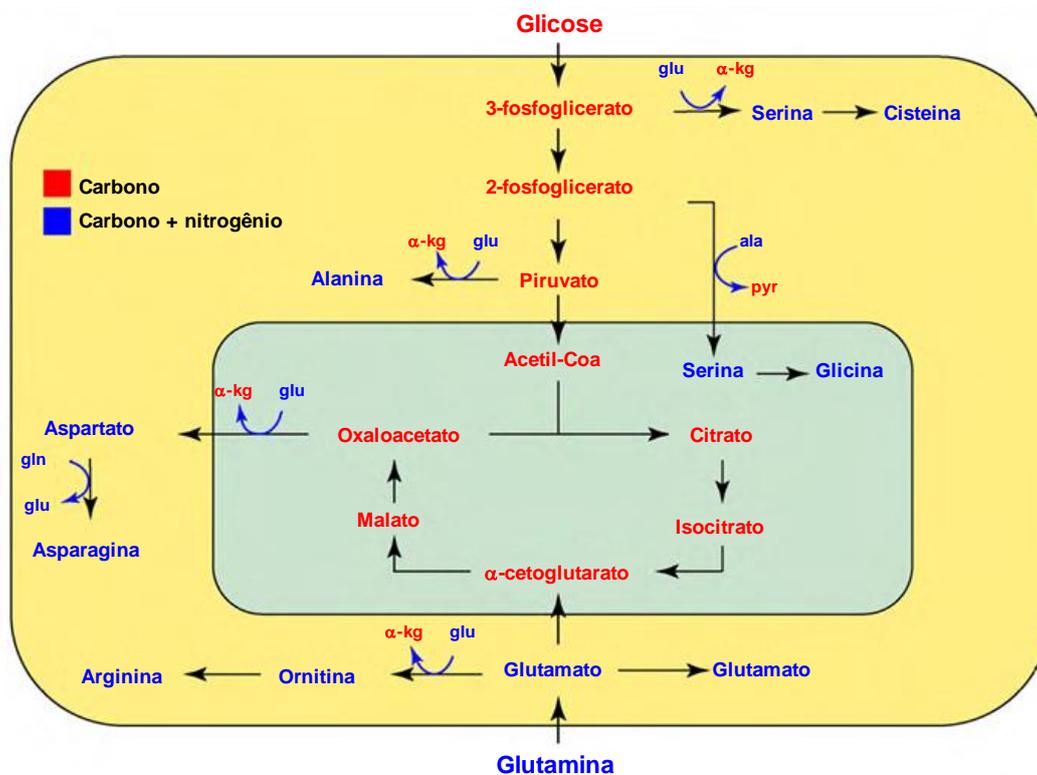


Figura 1. A glicose e a Gln podem fornecer carbono e nitrogênio para a síntese de aminoácidos não essenciais. Os compostos que contêm carbono, mas não nitrogênio, estão mostrados em vermelho; enquanto aqueles que contêm carbono e nitrogênio estão apresentados em azul. Os precursores de carbono derivados da glicólise (3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, piruvato) e da glutaminólise servem como substrato de carbono para a biossíntese de aminoácidos. Gln doa derivados do seu grupo amina para estes substratos de carbono para a produção de aminoácidos não essenciais (serina, alanina, aspartato, ornitina) e α -cetoglutarato (α -KG). A alanina (Ala), serve como doador de amina para produzir a serina e o piruvato (pyr) para a síntese de glicina na mitocôndria. A Gln fornece o carbono e nitrogênio para a síntese de prolina, ornitina e arginina. A Gln pode também servir como um doador de nitrogênio para a síntese direta de asparagina a partir do ácido aspártico. Figura adaptada de Wise DR et al., 2010.

No cérebro, a Gln, também serve como um precursor para a síntese de importantes substâncias neurotransmissoras. A Gln captada por neurônios, é catabolizada em glutamato (Glu), uma das substâncias neuroexcitatórias mais abundantes, e posteriormente é metabolizada no neurotransmissor ácido gama-amino butírico (GABA). A liberação de Gln e sua captação por neurônios completam um ciclo de utilização intercelular. A Gln faz parte do metabolismo intermediário e da desintoxicação de amônia e regulação do GABA (Glenn et al., 1985; Curthoys et al., 1995). No tecido cerebral, GABA e Glu são captados por astrócitos e convertidos em Gln, sendo então disponibilizada para neurônios pré-sinápticos.

2.1.1. Transportadores de Gln através da membrana plasmática

O transporte de aminoácidos através da membrana plasmática em células de mamíferos é mediado por diferentes sistemas de transporte (Nakanishi et al., 2011 e Fuchs et al., 2005).

- 1) Sistema dependente de sódio (Na): sistemas A, ASC, N e B^{0,+}
- 2) Sistema independente de Na: sistemas L, XC

Tabela 1. Tipo de transportadores de aminoácidos.

Sistema	proteína	gene	Substrato predominante	tipo de transporte/ ion acoplado	Localização
A	SNAT1	<i>SLC38A1</i>			12q13.11
	SNAT2	<i>SLC38A2</i>	A G S M P Q N H T	C/Na ⁺	12q
	SNAT4	<i>SLC38A4</i>			12q13
ASC	ASCT1	<i>SLC1A4</i>			2p15p13
	ASCT2	<i>SLC1A5</i>	K R A S C T N Q H	C/Na ⁺	19q13.3
L	LAT1	<i>SLC7A5</i>			16q24.3
	LAT2	<i>SLC7A8</i>			14q11.2
	LAT3	<i>SLC43A1</i>	H M L I V F Y W Q	Tr/AA	11q12.1
	4F2hc	<i>SLC3A2</i>			11q13
N	SNAT3	<i>SLC38A3</i>			3p21.3
	SNAT5	<i>SLC38A5</i>	A G H Q N	C/Na ⁺ & Tr/H ⁺	Xp11.23
B^{0,+}	ATB ^{0,+}	<i>SLC6A14</i>	M I L V F Y W	C/Na ⁺ & Cl ⁻	Xq23
XC⁻	Xct	<i>SLC7A11</i>	E C	Tr/AA	4q28-q32

Abreviatura de aminoácido por uma letra: A-alanina, C-cisteína, D-aspartato, E-glutamano, F-fenilalanina, G-glicina, H-histidina, I-isoleucina, K-lisina, L-leucina, M-metionina, N-asparagina, P-prolina, Q-glutamina, R-arginina, S-serina, T-treonina, V-valina, W-triptofano, Y-tirosina.
C: co-transportador, Tr; Troca, AA: aminoácido, T: demonstração por ensaio de transporte, G; ensaio de crescimento, I: inibidor não substrato.

O sistema A ocorre na quase totalidade dos tipos celulares e catalisa o transporte da maioria dos aminoácidos neutros pequenos, incluindo Ala, Ser, e Gln com íon Na⁺. A isoforma 1, SNAT1 é encontrada no neocortex, hipocampo e neuroepitélio, e mantém a disponibilidade de Gln nos astrócitos e glia como precursor do neurotransmissor Glu e GABA (Weiss et al., 2003). A expressão da isoforma 2, SNAT2 é ubíquita e do SNAT3 é restrita no fígado e no músculo esquelético (Sugawara et al., 2000). O aumento da expressão dos membros do sistema A tem sido descrito em carcinoma hepatocelular (Kondoh et al., 2007) e correlacionado à progressão do colangiocarcinoma (Yu et al., 2011).

O sistema ASC funciona tanto para o transporte intracelular de aminoácidos neutros dependentes de Na^+ , como também para troca de aminoácidos.

O primeiro transportador clonado no sistema ASC foi ASCT1, isolado em 1993 do córtex motor humano e hipocampo humano e em seguida, em 1996, foi isolado o ASCT2 de testículo de camundongo. ASCT2 apresenta alta afinidade ($K_m \sim 20 \mu\text{M}$) para aminoácidos neutros pequenos, incluindo asparagina e Gln. A afinidade de ASCT2 por um dado substrato é simétrico, sendo similar tanto para influxo como para efluxo. Desta forma, uma troca homo ou hetero troca de aminoácidos pelo ASCT2 é eletricamente neutra, pois envolve o co-transporte de um íon de Na^+ e um aminoácido neutro para dentro da célula acoplado à saída igualmente de um íon Na^+ e um aminoácido neutro. Atribuem-se duas funções ao ASCT2:

- 1) receptor de retrovírus durante o desenvolvimento placentário e fusão de células endoteliais em câncer de mama (Bierregaard et al., 2006 e Blond et al., 2000).
- 2) transporte de aminoácidos neutros, com alta afinidade a Gln (Bode et al., 1995 e Utsunomiya et al., 1996). ASCT2 localiza-se na membrana citoplasmática (Hannanein et al., 2003). Observa-se aumento da expressão de ASCT2 na superfície das células cancerosas que pode ser explicado pela dependência do câncer no metabolismo de Gln como suporte à alta demanda energética e biossíntese de macromoléculas. Estudos recentes têm demonstrado que a expressão de ASCT2 pode também ser independente do metabolismo da Gln, sendo esta necessária para a ativação de várias cascatas de sinalização do crescimento induzidos por mTOR e ERK em vários tipo de

câncer (Fuchs et al., 2007, Nicklin et al., 2009 e DeBerardinis et al 2007). A expressão aumentada de ASCT2 foi descrita em vários tumores, incluindo carcinoma hepatocelular, câncer colorretal (Witte et al., 2002), glioma (Dolinska et al., 2003) e metástases, sugerindo o desempenho de papel importante deste transportador na progressão tumoral.

O sistema L é tido como a rota maior para entrada de aminoácidos neutros. Os membros do sistema L apresentam-se associados à glicoproteínas, 4Fhc (cadeia pesada) (SLC3A2) ou rBAT (SLC3A1), com as quais se heterodimerizam. O primeiro transportador isolado do sistema L foi LAT1, em 1998, e apresenta uma chaperona 4F2hc, que quando estão co-expressos transportam aminoácidos neutros com cadeias laterais amplas, ramificadas ou aromáticas como leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, tirosina, histidina, triptofano e valina. LAT1 também transporta Gln e asparagina apesar da baixa afinidade (K_m de 1,6 e 2,1 μ M, respectivamente).

Há várias descrições de elevação da expressão de LAT1 em câncer colorretal (Yanagida et al., 2001 e Wolf et al., 1996), glioma (Nawashiro et al., 2006), carcinoma de esôfago (Kobayashi et al., 2005) e ovário (Kaji et al., 2010). Há, também, descrições de LAT1 como marcador de prognóstico em astrocitoma, carcinoma de próstata (Sakata et al., 2009), adenocarcinoma pulmonar (Kaira et al., 2009) e câncer de pulmão não oat cells (Kaira et al., 2008).

O sistema N media o transporte acoplado de Na^+ com aminoácidos neutros, incluindo Gln, Asn e His com troca por H^+ . O aumento na expressão de SNAT3 foi descrito como marcador de malignidade em gliomas (Sidoryk et al., 2004).

O sistema B⁰⁺ foi originalmente clonado em glândula mamária e transporta aminoácidos neutros e grandes incluindo Gln e leucina, como aminoácidos catiônicos como arginina. Foram descritos aumentos de expressão deste transportador em tumores coloretais (Gupta et al., 2005) e cervicais (Gupta et al., 2006).

Quatro transportadores são importantes fisiologicamente para o transporte de Gln (McGivan et al., 2007):

- 1) SNAT3 pela captura de Gln pelas células portais no fígado e pelas células do túbulo renal proximal. E, pela liberação de Gln pelas células hepáticas perivenosas;
- 2) SNAT1 pela captura de Gln pelas células neuronais;
- 3) ASCT2 essencial pela captura de Gln pelas células epiteliais e células tumorais em cultura;
- 4) B⁰AT1 (SLC6A19), recentemente descrito na borda em escova da membrana.

As evidências cumulativas, nas últimas duas décadas, apontam que a disponibilidade do aminoácido regula a fisiologia celular através da modulação da expressão gênica e das vias de transdução de sinal. As células tumorais competem com o hospedeiro por Gln circulante e por certos outros aminoácidos, por exemplo, asparagina, que desempenha papel crucial na sobrevivência de células linfoblásticas malignas (Hawkins et al., 2004). Por outro lado, vias dependentes de aminoácidos têm sido descritas em várias células, particularmente a via mTOR, que regula processos biológicos fundamentais no controle do crescimento celular e na tumorigênese.

O mecanismo de troca entre os transportadores ASCT2 e LAT1 pode servir para equilibrar pools citoplasmáticos de aminoácidos, sem gasto de energia por ocorrer através do gradiente eletroquímico de Na^+ . LAT1 e ASCT2 por definição, não podem mediar a captação líquida de aminoácidos *per se*, mas o mecanismo de hetero troca pode permitir a captação de substratos específicos na dependência da existência de um gradiente de concentração transmembrana para estes outros substratos (Fuchs et al., 2005). Tem sido proposto que a expressão de transportadores unidirecionais com sobreposição de seletividade do substrato (como os SNATs de SLC38) pode proporcionar o efluxo de substratos necessários para ASCT2 e LAT1 (Fuchs et al., 2005 e Wise et al., 2010).

ASCT2 media a captação de Gln, enquanto LAT1 utiliza concentrações de aminoácidos intracelulares gerados pelo ASCT2 para ajustar os níveis de aminoácidos essenciais para as demandas metabólicas através da sinalização de mTOR, ilustrado na Figura 2 (Wise et al., 2010).

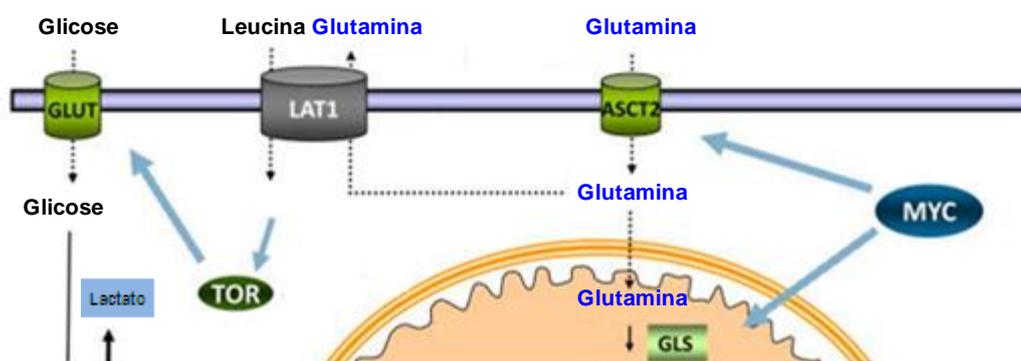


Figura 2. Esquema mostrando o balanço entre ASCT2 e LAT1, uma porção da Gln importada nas células tumorais através de ASCT2 é exportada por LAT1. Figura adaptada de Wise et al., 2010.

2.1.2. Glutaminólise

A glutaminólise é composta por uma série de reações bioquímicas na qual o aminoácido Gln é degradado em Glu, aspartato, piruvato, alanina e citrato (Mckeehan et al., 1982; Segura et al., 1989 e Dang et al., 2010), (Figura 3). A glutaminólise envolve etapas do CAT e ocorrem na mitocôndria (Mátes et al., 2009).

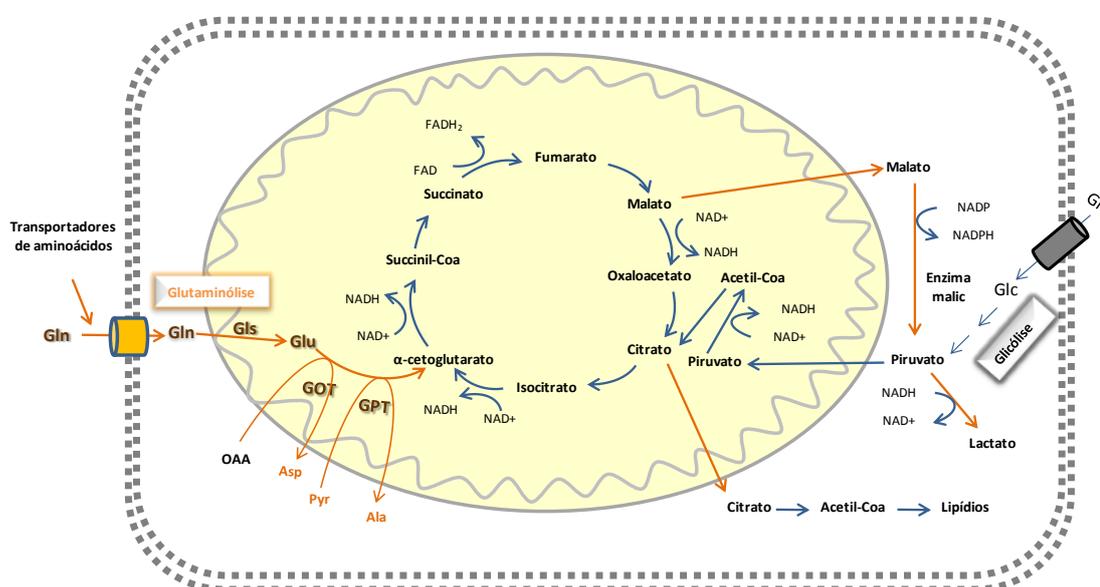


Figura 3. Esquema mostrando a glutaminólise envolvendo o ciclo do ácido tricarboxílico. Piruvato transaminase (GPT) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), catalisa a transferência do grupo amino do glutamato para piruvato e oxaloacetato para produzir alanina e aspartato. O principal destino da glutamina, após a sua conversão para o glutamato e a conversão do glutamato em α -cetoglutarato. Glutaminólise contribui para a produção de NADH mitocondrial, que é utilizada para sustentar a produção de ATP pela fosforilação oxidativa. O citrato, metabólito do CAT, pode também sair da mitocôndria para ser usado para a geração de acetil-CoA, um precursor da biossíntese de ácidos graxos, da mesma forma o malato produzido no CAT contribui para a produção de lactato e piruvato. Figura adaptada de Daya et al., 2012.

Gln: glutamina; Glu: glutamato; Gls: glutaminase; OAA: oxaloacetato; ASP: aspartato; Pyr : piruvato; Ala: alanina; GPT: glutamato: piruvato transaminase; GOT: glutamato oxaloacetato transaminase; Glc: glicose; CAT: ciclo do ácido tricarboxílico.

2.1.3. Glutaminase

A primeira etapa de desaminação da Gln para Glu é catalisada pela glutaminase (*GLS*), uma enzima mitocondrial altamente expressa em tumores e linhagens de células tumorais (DeBerardinis et al., 2010), como carcinoma mamário, fibrossarcoma e sarcoma osteogênico (Knox et al., 1969).

Descrevem-se dois tipos de glutaminase em humanos: tipo K (*kidney*) codificado pelo gene *GLS1* localizado no cromossomo 2 e tipo L (*liver*) codificado pelo gene *GLS2* localizado no cromossomo 12, (Matés et al., 2009 e Matés et al., 2013), Tabela 2.

Tabela 2. Tipo de glutaminases

gene	localização cromossômica	tipo	isoformas
<i>GLS (GLS1)</i>	2q32-q34	K (kidney)	longa - KGA
			curta - GAC
<i>GLS2</i>	12q13.3	L (liver)	longa - GAB
			curta - LGA

GLS1 possui 2 variantes em decorrência de splicing alternativos: isoforma KGA e isoforma GAC. A isoforma KAG é formada pelas junções dos exons 1-14 e 16-19, enquanto que a segunda variante GAC apresenta apenas os primeiros 15 exons, faltando os exons 16-19. A isoforma GAC foi originalmente isolada de uma biblioteca de cDNA HT-29 de colon humano e está expressa predominantemente em músculo cardíaco, pâncreas, placenta, rim e pulmão, mas não no fígado e no cérebro (Elgadi et al., 1999). Os níveis da proteína *GLS* estão aumentados em câncer de mama e de próstata comparado com o tecido normal (Wang et al., 2010). Knox et al., 1969 e Linder- Horowitz et al.

1969, demonstraram que a atividade da GLS correlaciona-se com taxas de crescimento tumoral *in vivo* e a redução experimental da sua atividade em xenotransplantes resultou na diminuição das taxas de crescimento de células tumorais (Lobo et al., 2000; Gao et al., 2009).

Demonstrou-se, recentemente, que Rho GTPases regulam o metabolismo da Gln através do controle da atividade da glutaminase. As células tumorais dependentes da sinalização de Rho GTPase apresentam alta atividade da glutaminase, com regulação dependente de NF- κ B, com aumento do crescimento e invasão tumoral (Wang et al, 2010).

Interessantemente, c-Myc, o fator de transcrição oncogênico, que regula miRNAs7-8 e estimula a proliferação, reprime transcricionalmente miR23a e miR23b resultando no aumento da expressão da glutaminase mitocondrial (GLS) (Gao et al 2009).

Foi também, recentemente, demonstrado que a isoforma GAC do GLS está localizado na mitocôndria, sendo ativada por fosfato inorgânico, cuja concentração é maior na mitocôndria sujeito à hipóxia (Cassago et al, 2012). Quantidades elevadas de mRNA de GAC foram detectadas em gliomas (Szeliga et al, 2005 e 2008), adenoma/carcinomas coloretais (Turner A & McGivan JD, 2003) e linhagens celulares de tumor mamário (Elgadi et al, 1999) em comparação às células normais.

GLS2 apresenta 18 exons codificantes e tem dois transcritos: GAB, isolado de células ZR75 de câncer de mama, e LGA, isolado de fígado de rato (Smith et al., 1990).

Estudos prévios sugerem que a ativação de GLS está associada ao aumento da proliferação celular, enquanto que a expressão de GLS2 associa-se ao estado celular em repouso, quiescente e não-proliferativo (Pérez-Gómez C et al, 2005). Foram demonstrados o aumento da expressão de GLS (isoformas KGA e GAC) e a baixa expressão de GLS2 em gliomas humanos malignos (Szeliga M et al 2005). Estudos *in vitro*, com indução da hiperexpressão de *GLS2* na linhagem de glioma T98G, mostraram a reversão do fenótipo transformado, o que permitiu especular que a hiperexpressão de *GLS2* possa alterar o programa transcricional das células de glioma levando ao fenótipo menos maligno e mais diferenciado (Szeliga M et al 2009). Similarmente, descreveu-se que a restauração da expressão de *GLS2*, demonstrada como baixa em glioblastomas e astrocitomas anaplásicos, inibe a proliferação e a migração das células tumorais (Ollala L et al 2002). Do mesmo modo, houve a diminuição da formação de colônias de células de carcinoma hepatocelular com indução da hiperexpressão de *GLS2* (Suzuki S et al, 2010). Estes achados em conjunto sugerem que *GLS2* desempenhe um papel de supressor tumoral (Hu et al, 2010).

GLS2 aumenta os níveis celulares de GSH e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hu et al 2010). Interessantemente, *GLS2* é mediador de p53, exercendo um papel no metabolismo energético, o qual contribui no seu papel de supressor de tumor, uma vez que a sua expressão é induzida em resposta ao dano do DNA e ao estresse oxidativo de modo dependente de p53 (Suzuki et al 2010). Desta forma, a indução de *GLS2* leva a um aumento do consumo de oxigênio, da respiração mitocondrial e da geração de ATP celular, com

redução dos níveis de ROS, o que protege a célula da morte celular induzida por estresse oxidativo (Lora et al 2004).

2.1.4 Conversão do glutamato a α -cetoglutarato

Após o catabolismo da Gln a Glu pela glutaminase, o metabolismo da Gln segue com a conversão do Glu em α -cetoglutarato, através de duas reações, catalisadas pelas seguintes enzimas:

1. Glutamato desidrogenase: codificada pelo gene *GLUD*
2. Glutamato transaminases: glutamato piruvato transaminase codificada pelo gene *GPT*, também chamada de alanina transaminase (ALT), ou Glutamato oxaloacetato transaminase, codificada pelo gene *GOT*, também chamada de aspartato transaminase (AST).

O gene *GLUD1*, localizado no cromossomo 10q23.3, é encontrado em todos os organismos vivos e catalisa uma deaminação oxidativa de Glu para α -cetoglutarato usando NAD(P)^+ como coenzima. *GLUD* está localizado dentro da matriz mitocondrial e cataboliza Glu para alimentar o CAT (Li et al., 2009). Glu é o principal substrato de *GLUD*, está presente no cérebro em altas concentrações mais do que em outros órgãos. No tecido nervoso, *GLUD* além de exercer função no catabolismo do Glu age também na detoxificação de amônia (Mavrothalassitis et al., 1988). Yang et al., 2009, observaram aumento da expressão de *GLUD* em linhagem celular de GBM quando da redução do metabolismo de glicose por via glicólítica, seja pela privação da glicose como

substrato, ou pela inibição da glicólise por reagente bloqueador como 2-deoxiglicose ou pela inibição da via Akt.

O gene *GPT*, localizado no cromossomo 8q24.3, codifica a alanina aminotransferase 1 (ALT1) citosólica, também conhecida como glutamato-piruvato transaminase 1. Esta enzima catalisa uma transaminação reversível entre alanina e α -oxoglutarato para gerar piruvato e Glu, exercendo um papel fundamental no metabolismo intermediário de glicose e aminoácido.

O gene *GPT2*, localizado no cromossomo 16q11.2, codifica duas enzimas piridoxais que catalisa a reação de transaminação reversível para originar Glu e piruvato. Essas transaminases têm um papel na gliconeogênese e no metabolismo dos aminoácidos. Estão expressas em altos níveis em músculo, gordura, rim e cérebro, e em baixos níveis no fígado e mama (Yang et al., 2002).

O gene *GOT* codifica uma enzima dependente de fosfato piridoxal da membrana citoplasmática (*GOT1*, cr. 10q24.1-q25.1) ou da membrana interna mitocondrial (*GOT2*, cr 16q21) e desempenha um papel no metabolismo de aminoácidos, da uréia e no CAT. As duas enzimas são homodiméricas e apresentam homologia (Shen et al., 2011). *GOT2* foi detectado no rim, placenta, estômago e baço (Pol et al., 1988). Son et al., 2013, reportaram a identificação da via não canônica do uso da Gln em adenocarcinoma ductal pancreático, onde estas células requerem Gln para o crescimento tumoral. A maioria das células utilizam *GLUD1* para converter o Glu em α -cetoglutarato na mitocôndria para prover este último ao CAT. No entanto, as células do adenocarcinoma ductal pancreático substituem esta via pela utilização da Gln

derivada do aspartato, transportando-a para o citoplasma onde pode ser convertida em oxaloacetato por GOT1.

2.2. Glutaminólise e astrocitomas

O papel da Gln no metabolismo das células tumorais foi amplamente documentado em hepatomas (Kovacevic et al., 1972), ascites de Ehrlich (Lazo et al., 1981), células HeLa (Reitzer et al., 1979) e em células renais tumorais (Kovacevic et al., 1972). No entanto, pouco se conhece sobre seu papel em células tumorais do cérebro, pois a Gln é componente central do metabolismo e da função cerebral. A Gln é o precursor de dois importantes aminoácidos neurotransmissores, Glu e GABA, (Portais et al., 1996). A neurotransmissão mediada por aminoácido no cérebro é baseada em uma compartimentalização celular, na qual os astrócitos, através da atividade da Gln sintetase especificamente astrogliar, são responsáveis pela produção de Gln para utilização nos neurônios (Portais et al., 1996). A exigência da Gln para o crescimento de células tumorais no cérebro leva a uma competição pelo aminoácido entre as células tumorais e as células não tumorais (Portais et al., 1996).

Em estudos com células de GBM humano, (DeBerardinis et al., 2007) confirmou-se o efeito Warburg ao verificar-se que a maior parte da glicose era metabolizada a lactato mas, apesar deste desvio o CAT continuava ativo devido a contribuição da Gln. A co-existência do metabolismo da glicose e da Gln nessas células resultou na produção de citrato contendo dois carbonos

derivados da glicose a partir do acetil-CoA e quatro carbonos derivados da Gln e do oxaloacetato. A utilização de citrato permitiu que carbonos derivados da glicose fossem transferidos para ácidos graxos. Assim a anaplerose baseado na Gln é necessária em algumas células tumorais como intermediários do CAT para o crescimento. A exportação do malato derivado da Gln para o citoplasma causa um curto-circuito no CAT, mas oferece substrato para enzima málica (ME) produzir nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A evidência sugere que este pode ser a maior fonte de NADH nas células tumorais. Em células de GBM humano, verificou-se que a glutaminólise seria capaz de produzir NADH mais que o suficiente para a síntese de ácidos graxos, sendo que o excedente poderia ser usado para a biossíntese de nucleotídeos e manutenção de um pool de glutathiona (GSH), (DeBerardinis et al., 2008).

2.3. Tumores do Sistema Nervoso Central

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são considerados raros. De acordo com estudos epidemiológicos, a incidência mundial de tumores cerebrais primários é de cerca de 7 indivíduos a cada 100.000 habitantes por ano, o que representa aproximadamente 2% do total dos tumores primários (Furnari *et al.*, 2007). Apesar de raros, estes tumores podem ser extremamente agressivos, sendo que apenas 3 a cada 100 indivíduos sobrevivem 5 anos após o diagnóstico (Ohgaki & Kleihues, 2005).

Os gliomas são um grupo heterogêneo de tumores primários neuroectodermiais, que se originam de células gliais, como astrócitos e

oligodendrócitos, ou de suas células progenitoras. Os gliomas mais comuns são os astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e gliomas mistos (oligoastrocitomas). Acometem 29% de todos os tumores e 80% dos tumores malignos, glioblastomas e astrocitomas representam 76% de todos os gliomas como mostrado na Figura 4, (Dolecek et al., CBTRUS, 2012).

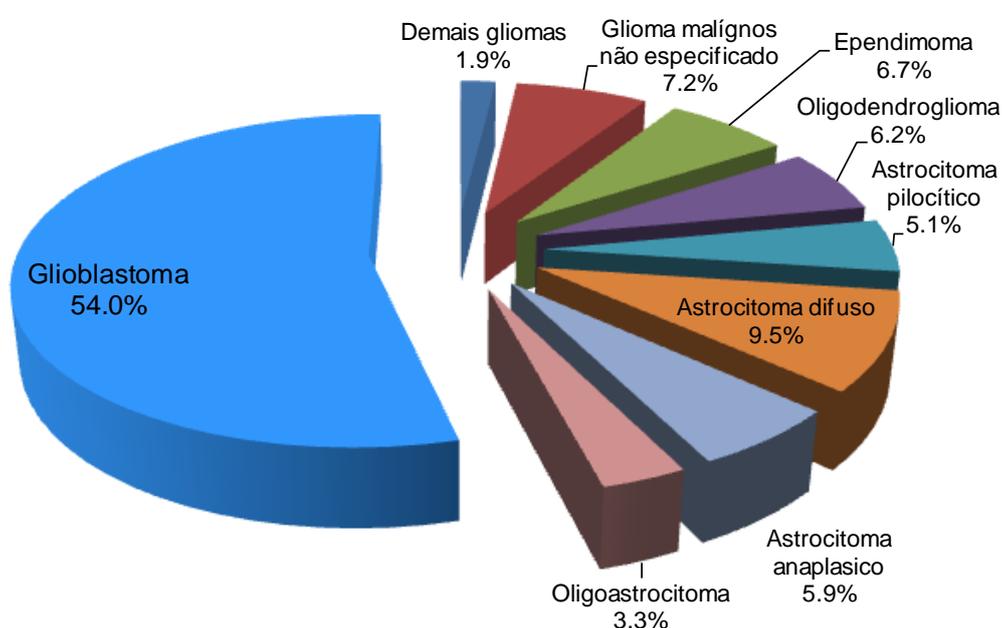


Figura 4. Distribuição dos gliomas quanto ao subtipo histológico. De um total de 90.828 casos reportados nos EUA no período de 2005-2009, nota-se que os astrocitomas representam 76% dos casos de glioma.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) os astrocitomas são classificados de acordo com a presença de indicadores morfológicos: 1) atipia nuclear, 2) mitoses, 3) proliferação endotelial, e 4) necrose (Louis et al., 2007).

Dessa maneira, a graduação de malignidade tumoral é determinada pela presença do número de indicadores, sendo que o astrocitoma grau I

(astrocitoma pilocítico) não apresenta nenhum dos indicadores; o grau II (astrocitoma de baixo grau ou difuso) apresenta um indicador de malignidade, geralmente atipia nuclear; o grau III (astrocitoma anaplásico) apresenta dois indicadores, geralmente atipia nuclear e mitoses; e o grau IV (glioblastoma) apresenta três ou quatro indicadores, atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e/ou necrose. Adicionalmente, os astrocitomas do grau II a IV são denominados astrocitomas difusamente infiltrativos, pela característica de invadir o tecido cerebral normal circunjacente (Louis et al., 2007), Tabela 3.

TABELA 3. Classificação dos astrocitomas quanto à malignidade e característica histológica, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).

	Grau	Nomeclatura	Características Histológicas
	I	Astrocitoma pilocítico	Ausência de anaplasia
Astrocitoma Difusamente Infiltrativo	II	Astrocitoma de baixo grau	1 critério de anaplasia: atipia nuclear
	III	Astrocitoma anaplásico	2 critérios: atipia nuclear e atividade mitótica
	IV	Glioblastoma	3 ou 4 critérios: atividade mitótica, proliferação endotelial e/ou necrose

2.3.1. Astrocitoma Pilocítico (grau I)

Astrocitomas pilocíticos são, em geral, circunscritos, de crescimento lento e mais comum em crianças e adultos jovens (Louis et al., 2007; Reifenberger & Collins, 2004). A maioria desses tumores (85%) se desenvolvem no cerebelo (Louis et al., 2007; Reifenberger & Collins, 2004).

Outras regiões típicas (10%) incluem estruturas como o nervo óptico e quiasma óptico, hipotálamo, tálamo, gânglios da base e tronco cerebral. Entretanto, astrocitomas pilocíticos também podem ser encontrados nos hemisférios cerebrais ou na medula espinhal. Macroscopicamente essas neoplasias apresentam-se como maleáveis, acinzentadas e, frequentemente, com lesões císticas (Reifenberger & Collins, 2004). Histologicamente são caracterizadas por baixa ou moderada celularidade, padrão bifásico com proporções variadas de células bipolares compactadas com presença de fibras de Rosenthal e células soltas de estruturas multipolares com microcistos e corpos granulares (Louis et al., 2007).

Dessa maneira, segundo a OMS, os astrocitomas pilocíticos possuem excelente prognóstico após ressecção cirúrgica (Louis et al., 2007).

2.3.2. Astrocitoma difuso ou de baixo grau (grau II)

Os astrocitomas de baixo grau ocorrem predominantemente no gênero masculino e afetam frequentemente adultos jovens, com um pico na terceira década de vida, entre 30 e 40 anos (Louis et al., 2007). Esses tumores representam de 10 a 15% de todos os tumores astrocíticos e podem estar localizados em qualquer região do SNC, mas preferencialmente nos hemisférios cerebrais, com infiltração difusa de estruturas adjacentes ao tumor (Louis et al., 2007). Após intervenção cirúrgica, a média de sobrevida é de cerca de 6 a 8 anos, embora haja uma variação individual, com alguns casos permanecendo latentes por vários anos e outros progredindo rapidamente para astrocitomas de maior grau de malignidade (Daumas-Duport et al., 1988). Na

recidiva tumoral de astrocitoma grau II, a segunda amostra cirúrgica frequentemente mostra características de astrocitoma anaplásico, como hipercromasia, aumento de atipia nuclear, atividade mitótica, e, eventualmente, características de glioblastoma, como proliferação microvascular e/ou necrose. A progressão para a anaplasia é imprevisível, assim como o tempo que estas mudanças levam para ocorrer (Louis et al., 2007).

2.3.3. Astrocitoma anaplásico (grau III)

Os astrocitomas anaplásicos acometem preferencialmente homens adultos com idade média de 41 anos, são tumores infiltrativos com anaplasia focal ou dispersa e um grande potencial proliferativo. Sua localização é semelhante a dos astrocitomas de baixo grau, com preferência pelos hemisférios cerebrais (Louis et al., 2007).

Estes tumores se originam da progressão de um astrocitoma de baixo grau, e, em um intervalo médio de aproximadamente 2 anos, possuem uma tendência intrínseca a progredirem para glioblastomas (GBM) (Watanabe et al., 1997). Assim, dos pontos de vista clínico, morfológico e genético, pode-se considerar que o astrocitoma anaplásico constitui um estágio intermediário na rota de progressão para um GBM.

2.3.4. Glioblastoma (grau IV)

Os GBMs são os mais malignos dos tumores astrocíticos perfazendo cerca de 50% dos mesmos e de 20 a 25% do total das neoplasias intracranianas, tornando-os tumores mais frequentes do SNC (Surawicz et al., 1999). GBMs ocorrem mais frequentemente na substância branca dos hemisférios cerebrais e podem se manifestar em qualquer idade, mas afetam preferencialmente homens adultos entre 45 e 70 anos de idade com incidência de aproximadamente 70% (Louis et al., 2007). Os GBMs primários são mais frequentes em idade média de 55 anos e se manifestam *de novo*, ou seja, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica da existência de uma lesão menos maligna anterior, após uma história clínica muito curta, normalmente menos de 3 meses. Este tipo de GBM parece ser resistente à radioterapia, com lesões altamente infiltrativas e, deste modo, tem um pior prognóstico (Ohgaki & Kleihues, 2013).

Os GBMs secundários se desenvolvem tipicamente em pacientes mais jovens (idade média de 45 anos), através da progressão de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico. O tempo de evolução varia consideravelmente, com intervalos entre um ano ou mais de 10 anos. Os GBMs secundários ocorrem em pacientes com história clínica e biópsias sequenciais de astrocitomas de menor grau, conforme mostrado na Figura 5, (Furnari et al., 2007).

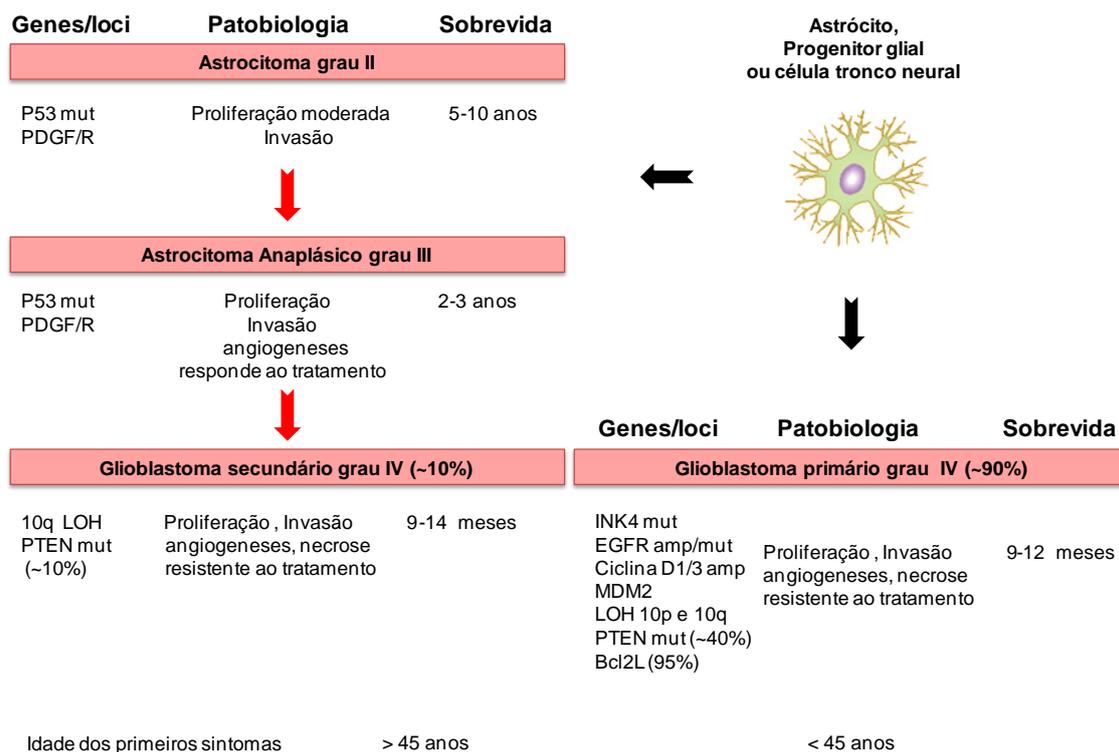


Figura 5. Vias de alterações genéticas envolvidas na progressão dos astrocitomas. O esquema mostra que o glioblastoma secundário se desenvolve a partir de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico, e glioblastoma primário se manifesta *de novo*, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica da existência de uma lesão menos maligna anterior. Figura adaptada de Furnari et al., 2007.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Analisar o processo da glutaminólise em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.

3.2. Objetivos específicos

1. Identificar e selecionar os genes da via da glutaminólise com base nos resultados prévios de *microarray de oligonucleotídeos*.
2. Validar a expressão gênica dos genes selecionados em um conjunto independente de amostras de astrocitomas de diferentes graus de malignidade.
3. Análise de co-expressão dos genes entre os diferentes graus de astrocitomas.
4. Correlacionar os resultados de expressão gênica com tempo de sobrevida nos pacientes com glioblastoma.

4. Casuística & Metodologia

4.1. Casuística

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

O presente estudo encontra-se inserido no Projeto Temático da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nº

04/12133-6: “Procura de marcadores moleculares relacionados ao diagnóstico e prognóstico de tumores do sistema nervoso central”, aprovado pela CAPPesq (Protocolo de Pesquisa nº 681/05), e deste estudo pela CAPPesq (protocolo nº 0598/10), intitulado: Glutaminólise em Astrocitomas (anexo 1), financiado pelo CNPq, Edital Chamada Universal 14/2011 processo 483467/2011-1. Os consentimentos pós-informados foram obtidos de todos os pacientes com tumor e epilepsia ou de seus responsáveis legais, Os pacientes foram acompanhados clinicamente com protocolos padronizados no que tange a tratamentos complementares, radioterapia e quimioterapia, bem como na análise da progressão/recorrência tumoral por neuroimagem.

As amostras tumorais congeladas foram processadas através da realização de criocortes de 4µm, e coloração com hematoxilina e eosina (HE) para verificação da qualidade do tecido. As porções de tecidos não tumorais, necrose e áreas com hemorragia foram dissecadas previamente à extração de DNA/RNA total.

A casuística total consistiu de 175 amostras, sendo 22 tecidos não neoplásicos, 23 astrocitomas grau I, 26 astrocitomas grau II, 18 astrocitomas grau III e 86 glioblastomas.

4.2. Metodologia

4.2.1. Extração de RNA total

A extração foi realizada utilizando o Kit *RNeasy Mini* (Qiagen Inc, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações dos

RNA extraídos foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific, Delaware, EUA*). Posteriormente, a qualidade do RNA extraído foi verificada através de corrida eletroforética em gel denaturante de agarose 1%. As amostras de RNA foram estocadas a -70°C até sua utilização.

4.2.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 1µg de RNA total por transcrição reversa com Superscript III (*SuperScript III Reverse Transcriptase ; Life Technologies, Carlsbad, Califórnia*) utilizando-se inibidor de Rnase (*RNaseOUT*), oligo dT e *primers* randômicos, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (*Life Technologies, Carlsbad, Califórnia*). Foi realizada inicialmente, uma digestão com DNase (*USB Corporation, Ohio, EUA*), e no final, uma digestão com 1U RNase H (USB) para degradar as fitas simples de RNA. O cDNA foi diluído em TE (Tris/EDTA) e armazenado a -20°C para subsequente análise da expressão gênica.

4.2.3. Análise dos resultados de expressão gênica por *microarray* de oligonucleotídeos e seleção de genes

Em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa (*Marie et al., 2008*), foram utilizadas para hibridização de *microarrays* de oligonucleotídeos 55K (*Codelink, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA*) um conjunto de RNA de amostras de tecidos: controles (três pools com três amostras cada de tecido cerebral não neoplásico), 6 amostras de astrocitomas

grau I, 7 amostras de astrocitomas grau II e 3 amostras de GBM. Os valores de fluorescências normalizadas foram utilizados para as análises. A seleção dos genes foi feita comparando-se os níveis de expressão dos genes nos tecidos tumorais em relação aos níveis de expressão nos tecidos não neoplásicos.

4.2.4. Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Na análise quantitativa, as expressões dos genes selecionados foram normalizadas pela média geométrica de três genes de referência: *hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)*, *glucuronidase beta (GUSB)* e *TATA box binding protein (TBP)* (Vandesompele *et al.*, 2002; Kok *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2009).

Todos os ensaios foram feitos em duplicata em uma mistura com volume final 12 µL, contendo 3 µL de amostra (cDNA), 6 µL de *Power SYBR Green I Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia)* e 3 µL do par de *primers* nas concentrações finais otimizadas. As condições das reações consistiram em: 2 min a 50°C para ativação da *uracil N-glicosilase*, 10 min de ativação da DNA polimerase a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C e um minuto de pareamento e extensão a 60°C, seguido de um estágio de curva de dissociação, realizado no aparelho *ABI Prism 7500 (Life Technology, Carlsbad, Califórnia)*. As reações foram repetidas quando os valores de *cycle threshold (Ct)* das duplicatas ultrapassaram um desvio padrão de 0,4.

Os *primers* para a análise de expressão gênica foram desenhados em exons diferentes para evitar amplificações de DNA genômico, e a formação de estrutura secundária, dímeros ou homologia com pseudogenes, para amplificação de produtos de 87 a 120pb. A amplificação de produto único foi

confirmada através da análise de suas curvas de dissociação. Os produtos de PCR foram analisados quanto ao tamanho correto do produto amplificado em eletroforese em gel de agarose, corados com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia). Para cada reação, foram testadas diversas concentrações de *primers*, sendo selecionada a concentração mínima que não interferisse na eficiência da reação. A eficiência de amplificação foi calculada pela fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$, utilizando-se diluições seriadas de cDNA. Na Tabela 4, estão descritas as sequências dos *primers* utilizadas, os respectivos tamanhos dos produtos de PCR e as concentrações finais dos primers otimizados.

A equação $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizada no cálculo da expressão absoluta para primers com eficiência ($E=100 \pm 10\%$), onde $\Delta Ct = \text{média Ct gene} - \text{média geométrica do Ct dos 3 normalizadores}$, (Livak & Shmittgen, 2001). Para eficiências menores que 90%, os cálculos foram corrigidos segundo a fórmula $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$, (Pfaffi, 2001). Os resultados estão apresentados em gráficos utilizando escala logarítmica de base 10 para melhor visualização.

A Figura 6 mostra um exemplo de padronização de um gene representando curva de dissociação (Fig.6), curva padrão (Fig.6B), e eletroforese em gel de agarose (Fig.6C), com os respectivos tamanhos de produtos analisados.

Tabela 4. Descrição dos genes com as respectivas sequências de nucleotídeos (primers), tamanho dos produtos de PCR, e concentração final dos primers utilizada nas reações. Pares de bases (pb).

Genes de referência	Genes	Primers	Produto (pb)	[] final na reação
	<i>HPRT</i>		F: TGA GGA TTT GGA AAG GGT GT R: GAG CAC ACA GAG GGC TAC AA	118
<i>GUSbeta</i>		F: AAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA	101	400nM
<i>TBP</i>		F:AGGATAAGAGAGCCACGAACCA R: CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT	98	200nM
Glutaminólise	<i>ASCT2/ SLC1A5</i>	F: TCCGCTTCTTCAACTCCTTCA R: CACATCCTCCATCTCCACGA	119	200nM
	<i>LAT1/ SLC7A5</i>	F: ATCCTCTCCATGATCCACCCA R: GCGTAGAGCAGCGTCATCAC	80	600nM
	<i>GLS</i>	F: CAGGGCAGTTTGCTTTCCAT R: GAGACCAGCACATCATACCCAT	102	200nM
	<i>GLS /ISO1</i>	F: GCAGAGGGTTCATGTTGAAGTTGT R: GGTGTCCAAAGTGCAGTGCTT	115	200nM
	<i>GLS /ISO2</i>	F: ATCCTCGAAGAGAAGGTGGTGA R: GCAAGTTCTTGTGGAGACTTTCA	76	400nM
	<i>GLS2</i>	F: GGGCAGAAATTCGGAACAAGA R: ATGGCTGACAAGGCAAACCT	92	200nM
	<i>GLUD1</i>	F: TGGCATAACAATGGAGCGT R: TCTCAATGGCATTACATAGGCA	106	400nM
	<i>GOT1</i>	F: CTGTGCCAGTCCTTCTCCA R: GATGCTCTCAGGTTCTTTTCCAA	87	400nM
	<i>GOT2</i>	F: CTTGAGGTTGGAGACCAGTTGAGT R: GATTGCTGCTGCCATTCTGA	115	400nM
	<i>GPT2</i>	F: GGCTTTGGGCAGAGGGAA R: TCACGCGTACTTCTCCAGGAA	90	200nM

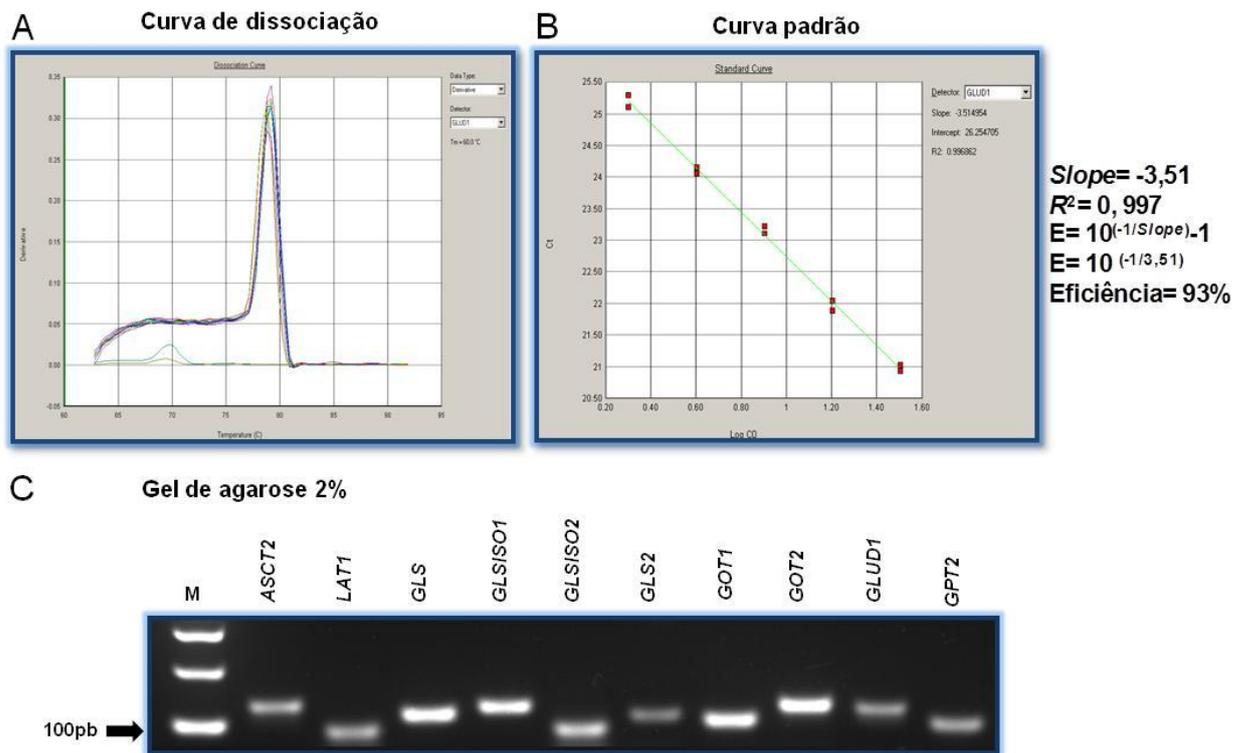


Figura 6. Curva de dissociação (A), curva padrão (B), representativas do gene *GLUD1* obtidas de diluições seriadas de cDNA controle em reações qRT-PCR. Eletroforese em gel de agarose (C) dos produtos de qRT-PCR dos genes: M (marcador de tamanho molecular 100pb), *ASCT2* (119pb), *LAT1* (80pb), *GLS* (102pb), *GLS/SO1* (115pb), *GLS/SO2* (76pb), *GLS2* (92pb), *GOT1* (87pb), *GOT2* (115pb) e *GLUD1* (106pb), *GPT2* (95pb).

4.3. Análise estatística

A distribuição dos dados foi analisada utilizando-se o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. A diferença de expressão dos genes entre amostras de tecidos NN e GBM foi analisada através do teste *Mann-Whitney*, para amostras não paramétricas, e *t*-teste, para amostras paramétricas. Para análise da expressão relativa dos genes estudados na casuística ampliada, ou seja, entre as amostras de tecidos NN e dos astrocitomas de diferentes graus de malignidade, o teste utilizado foi *Kruskal Wallis* e a comparação de *Dunn*.

A coexpressão entre os genes estudados foi realizada através da Correlação de *Pearson* (paramétrico) e *Spearman-rho* (não paramétrico). O coeficiente de correlação $r \geq 0,7$ foi considerado forte correlação, $0,3 \leq r < 0,7$ correlação moderada e $r < 0,3$, correlação fraca. Valores negativos de r foram interpretados como grandezas inversamente proporcionais.

As significâncias estatísticas foram estabelecidas quando $p < 0,05$. Todos os cálculos estatísticos foram realizados através do programa SPSS versão 15.0 (*IBM, EUA*) e os gráficos de dispersão foram feitos pelo programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc., EUA*).

5. Resultados

5.1. Seleção dos genes a partir dos dados de microarray de oligonucleotídeos

A seleção dos genes envolvidos na via da glutaminólise e do transportador da Gln (*GLS*, *GLS2*, *GOT1*, *GOT2*, *GLUD1*, *GPT2*, *ASCT2* e *LAT1*) foi realizada *in silico* a partir dos dados de níveis de fluorescência normalizados de *microarrays* de oligonucleotídeos (plataforma *CodeLink*) já disponíveis no nosso laboratório. Foi calculada a razão das médias dos valores de fluorescência das amostras de tumores *versus* normais (T/N) (Tabela 5).

Tabela 5. Enzimas e os transportadores com a sigla oficial dos genes correspondentes da glutaminólise e a razão da média dos valores de fluorescência dos dados de *microarray* de oligonucleotídeos dos tumores e do tecido cerebral não-neoplásico (T/N).

Nome da enzima	Gene	T/N
Transportador de aminoácido neutro (<i>SLC1A5</i>)	<i>ASCT2</i>	1,49
Transportador de aminoácido cadeia leve (<i>SLC7A5</i>)	<i>LAT1</i>	0,68
Glutaminase	<i>GLS</i>	0,34
Glutaminase tipo 2	<i>GLS2</i>	0,16
Glutamato desidrogenase 1	<i>GLUD1</i>	0,35
Glutamato oxaloacetato transaminase (citoplasmático)	<i>GOT1</i>	0,83
Glutamato oxaloacetato transaminase (mitocondrial)	<i>GOT2</i>	18,18
Glutamato piruvato transaminase	<i>GPT2</i>	0,93

Os gráficos de dispersão da fluorescência em diferentes graus de astrocitomas (AGI, AGII e AGIV) e tecidos não neoplásicos (NN) são demonstrados a seguir (Figuras 7A-7H).

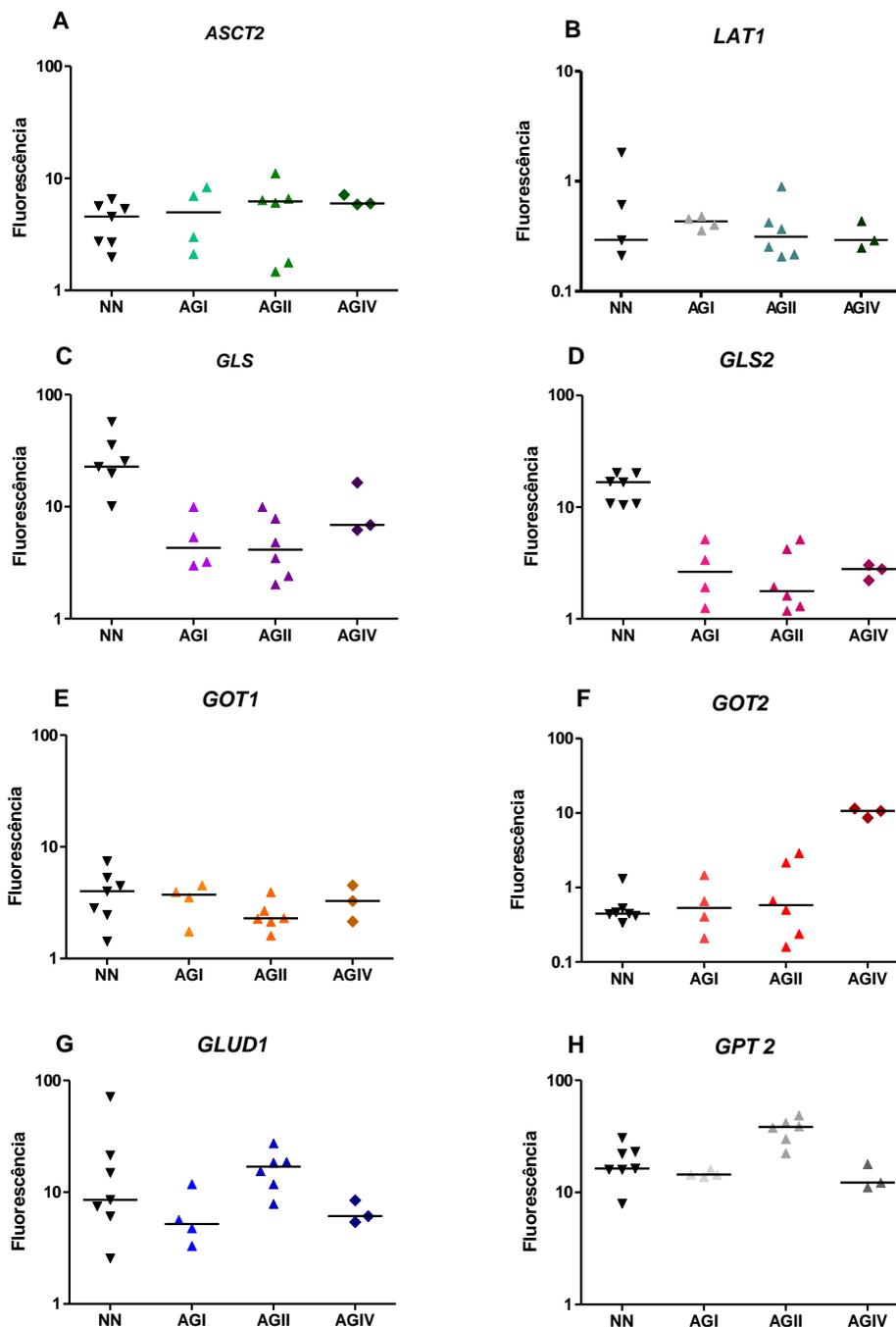


Figura 7. Gráficos de dispersão da fluorescência obtida nos experimentos de *microarray* de oligonucleotídeos (plataforma CodeLink 55K) dos genes envolvidos na glutaminólise *ASCT2* (A), *LAT1* (B), *GLS* (C), *GLS2* (D), *GOT1* (E), *GOT2* (F), *GLUD1* (G) e *GPT2* (H). As linhas horizontais representam as medianas dos valores. O eixo Y está em escala logarítmica para melhor visualização. (NN: não neoplásico, AGI: astrocitoma pilocítico, AGII: astrocitoma difuso e AGIV: glioblastoma).

5.2. Validação da expressão gênica dos alvos selecionados em casuística ampliada

A expressão de *ASCT2*, *LAT1*, *GLS*, *GLS ISO1*, *GLS ISO2*, *GLS2*, *GLUD1*, *GOT1*, *GOT2* e *GPT2* foram validados por qRT-PCR em uma casuística ampliada de amostras de cDNA de 22 tecidos NN e diferentes graus de astrocitomas, sendo 23 AGI, 26 AGII, 18 AGIII e 86 AGIV, totalizando 175 amostras.

5.2.1. Transportadores da glutamina

Uma porção da glutamina importada para as células cancerosas através de *ASCT2* é exportada diretamente por *LAT1*, com o intuito de avaliar se este evento ocorre em nossa casuística analisamos ambos os genes.

Transportador de aminoácido neutro (*SLC1A5/ASCT2*)

As amostras tumorais apresentaram hiperexpressão de *ASCT2* em relação às amostras de tecidos cerebrais NN. O padrão de expressão entre os astrocitomas difusamente infiltrativos (AGII a AGIV) foi crescente em paralelo ao aumento da malignidade. Interessantemente, a expressão mediana de *ASCT2* nos astrocitomas pilocíticos foi similar à expressão mediana dos astrocitomas mais malignos (AGIII e AGIV) e significativamente maior que no AGII.

Houve diferença significativa entre os níveis de expressão de RNAm de *ASCT2* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos NN ($p < 0,00005$, teste de *Kruskal Wallis*). Quando analisadas as expressões entre os grupos dois a

dois, os níveis de expressão de *ASCT2* em AGI, AGII, AGIII e AGIV e comparadas as de tecidos NN, as diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,00005$; $p < 0,0051$; $p < 0,00005$; $p < 0,00005$; respectivamente, teste de *Dunn*). Houve diferença também dos níveis de expressão de *ASCT2* de AGII quando comparados a AGI, AGIII e AGIV ($p < 0,0115$; $p < 0,0181$; $p < 0,0073$; respectivamente, teste de *Dunn*), conforme ilustra a Figura 8A. As medianas dos níveis de expressão de *ASCT2* dos tecidos NN, AGI, AGII, AGIII e AGIV foram de 0,10; 0,75; 0,36; 0,91 e 0,85, respectivamente.

Transportador de aminoácido cadeia leve (*SLC7A5/LAT1*)

Houve diferença significativa entre os níveis de expressão de RNAm de *LAT1* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos NN ($p < 0,005$, *Kruskal Wallis*) Figura 8B. As medianas dos níveis de expressão de *LAT1* dos tecidos NN, AGI, AGII, AGIII e AGIV foram de: 0,18, 0,18, 0,25, 0,42 e 0,36 respectivamente.

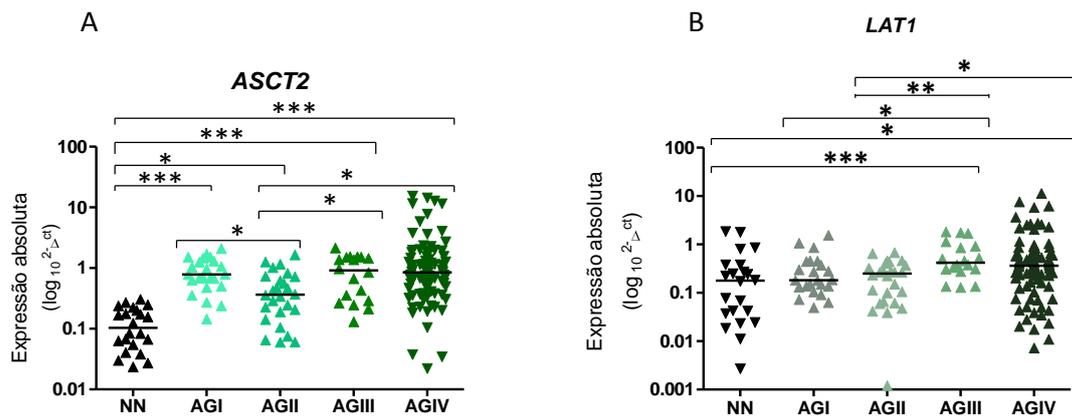


Figura 8. Gráficos de dispersão demonstrando a expressão (ΔCT) de *ASCT2* em A e *LAT1* em B de amostras humanas de tecido cerebral não neoplásico (NN), astrocitoma pilocítico (AGI), astrocitoma de baixo grau (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (AGIV). As barras horizontais representam as medianas das expressões em cada grupo de amostras. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$, análise *post-hoc* entre dois grupos pelo teste de *Dunn*).

5.2.2. Conversão de Gln a Glu

Após o transporte de Gln para o interior da célula, há a sua conversão para Glu mediada por glutaminase. As glutaminases são constituídas por dois principais membros (*GLS* e *GLS2*), e são codificadas por genes em cromossomos distintos. *GLS* por sua vez codifica duas isoformas, denominadas KGA e GAC.

Heuvel et al., 2012 demonstraram que há diferenças de expressão das glutaminases em diferentes tipos de tumores, sendo assim analisamos *GLS* total e as suas isoformas 1 e 2 (*GLS ISO1* e *GLS ISO2*) e *GLS2* total.

GLS

Não houve diferença significativa entre os níveis de expressão do RNAm de *GLS* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos NN ($p > 0,005$, teste de *Kruskal Wallis*) como mostrado na Figura 9A. As medianas dos níveis de expressão gênica de *GLS* dos tecidos NN, AGI, AGII, AGIII e AGIV foram de 0,66; 0,90; 0,87; 1,11 e 0,72, respectivamente.

GLS2

Houve diferença significativa entre os níveis de expressão de RNAm de *GLS2* em astrocitomas de diferentes graus e tecido NN ($p < 0,00005$, *Kruskal Wallis*). Quando analisadas as expressões entre os grupos dois a dois comparadas a NN, os níveis de expressão de *GLS2* em AGI, AGII, AGIII e AGIV foram estatisticamente significativos ($p < 0,00005$; 0,0001; $< 0,0002$; $< 0,00005$; respectivamente, teste de *Dunn*) como ilustra a Figura 9B. As medianas dos níveis de expressão de *GLS2* dos tecidos NN, AGI, AGII, AGIII e AGIV foram de 0,52; 0,01; 0,03; 0,05 e 0,01, respectivamente.

GLS ISO1

Houve diferença significativa entre os níveis de expressão do RNAm de *GLS ISO1* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos NN ($p < 0,0005$ teste de *Kruskal Wallis*) como mostrado na Figura 9C. As medianas dos níveis de expressão gênica de *GLS ISO1* dos tecidos NN, AGI, AGII, AGIII e AGIV foram de 1,43; 0,32; 0,39; 0,55; 0,27, respectivamente.

GLS ISO2

Houve diferença significativa entre os níveis de expressão do RNAm absoluta de *GLS ISO2* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos NN ($p < 0,00005$, *Kruskal Wallis*) como mostrado na Figura 9D. As medianas dos níveis de expressão de *GLS ISO2* dos tecidos NN, AGI, AGII, AGIII e AGIV foram de 0,07; 0,30; 0,25; 0,62; 0,36, respectivamente.

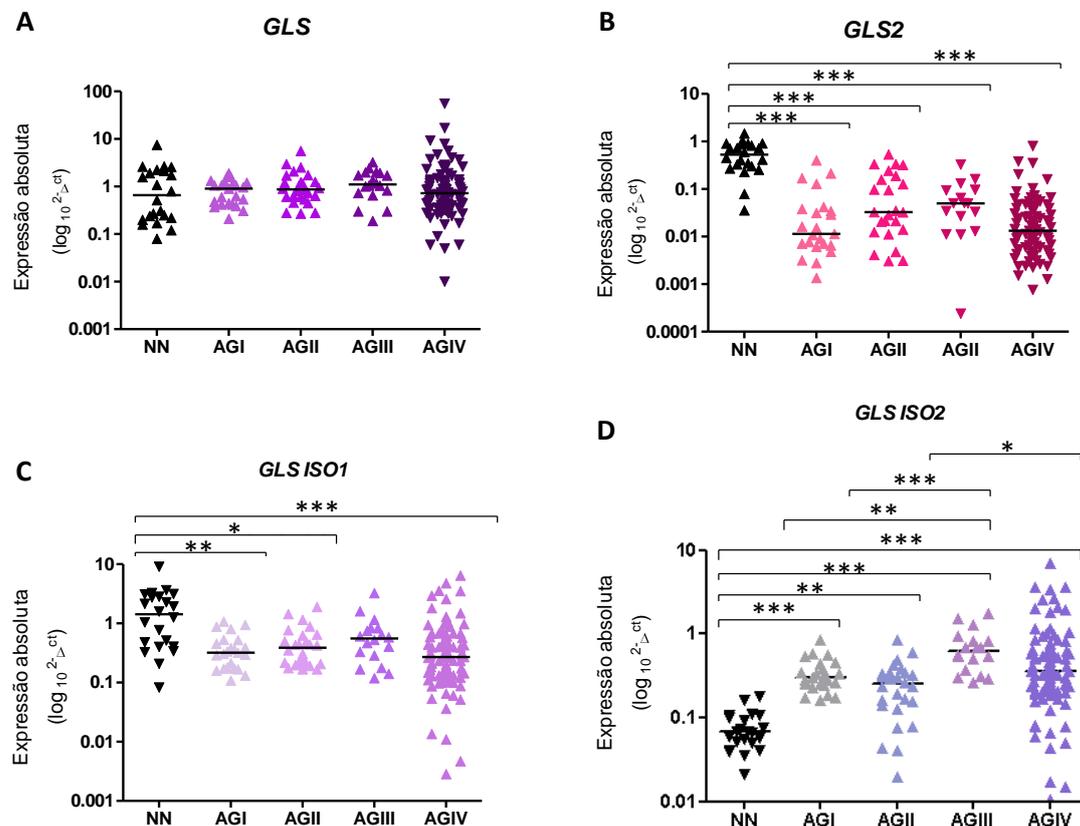


Figura 9. Gráficos de dispersão demonstrando a expressão (ΔCT) de *GLS* em A, *GLS2* em B, *GLS ISO1* em C, *GLS ISO2* em D e de amostras humanas de tecido cerebral não neoplásico (NN), astrocitoma pilocítico (AGI), astrocitoma de baixo grau (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (AGIV). As barras horizontais representam as medianas das expressões em cada grupo de amostras (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$, análise *pos-hoc* entre dois grupos pelo teste de *Dunn*).

5.2.3. Conversão de Glu a α -cetogluturato

A conversão do Glu para α -cetogluturato, substrato que integra o ciclo de ácidos tricíclicos pode ser realizada por diversas enzimas: glutamato desidrogenase (GLUD1) e glutamato transaminases que podem utilizar substratos distintos como oxaloacetato (glutamato oxaloacetato transaminase – GOT) e piruvato (glutamato piruvato transaminase – GPT).

Glutamato desidrogenase 1 (*GLUD1*)

O gene *GLUD1*, localizado no cromossomo 10q23.3, codifica a enzima desidrogenase da matriz mitocondrial e catalisa uma deaminação oxidativa do Glu para α -cetogluturato e amônia.

Observou-se diferença significativa entre os níveis de expressão de RNAm de *GLUD1* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos NN ($p < 0,00005$, *Kruskal Wallis*). As medianas dos níveis de expressão de *GLUD1* dos tecidos NN, AGI, AGII, AGIII e AGIV foram de 8,08; 4,58; 7,86; 11,02 e 3,58, respectivamente. As diferenças estatísticas com significância entre os níveis de expressão de *GLUD1* entre os diversos graus de astrocitomas e tecido NN estão demonstradas na Figura 10.

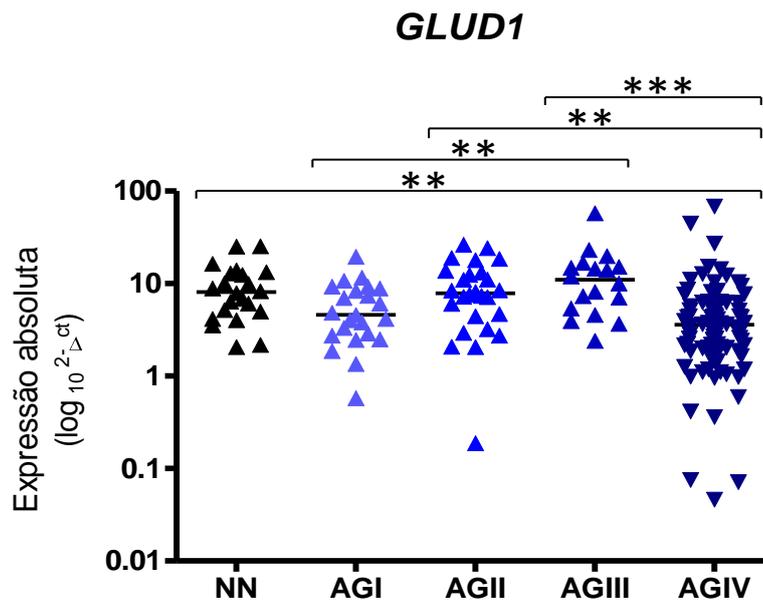


Figura 10. Gráficos de dispersão demonstrando a expressão (ΔCT) de *GLUD1* de amostras humanas de tecido cerebral não neoplásico (NN), astrocitoma pilocítico (AGI), astrocitoma de baixo grau (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (AGIV). As barras horizontais representam a mediana das expressões em cada grupo de amostras (** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$, análise *pos-hoc* entre dois grupos pelo *Dunn test*).

O gene *GOT* codifica uma enzima dependente de fosfato piridoxal da membrana citoplasmática (*GOT1*, cr. 10q24.1-q25.1) e outra na membrana interna mitocondrial (*GOT2*, cr 16q21). Analisamos a expressão gênica da enzima nas duas topografias.

Glutamato oxaloacetato transaminase (*GOT1*)

Houve diferença significativa entre os níveis de expressão do RNAm de *GOT1* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos NN ($p < 0,00005$, *Kruskal Wallis*). Quando analisadas as expressões entre os grupos dois a dois comparadas a NN, as diferenças dos níveis de expressão de *GOT1* em AGI,

AGII, AGIII e AGIV foram estatisticamente significativos ($p < 0,0002$; $p = 0,00005$; $p < 0,00002$; $p < 0,00005$; respectivamente, pelo teste de *Dunn*), ilustrado na Figura 11A. As medianas dos níveis de expressão de *GOT1* dos tecidos NN, AGI, AGII, AGIII e AGIV foram de 6,60; 1,08; 0,67; 1,02 e 0,80 respectivamente.

Glutamato oxaloacetato transaminase (*GOT2*)

Houve diferença significativa entre os níveis de expressão de RNAm de *GOT2* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos NN ($p < 0,005$, *Kruskal Wallis*). As medianas dos níveis de expressão de *GOT2* dos tecidos NN, AGI, AGII, AGIII e AGIV foram de 2,79; 1,45; 1,40; 2,30 e 1,94, respectivamente. As diferenças estatísticas com significância dos níveis de expressão nas comparações dos grupos dois a dois estão demonstradas na Figura 11B.

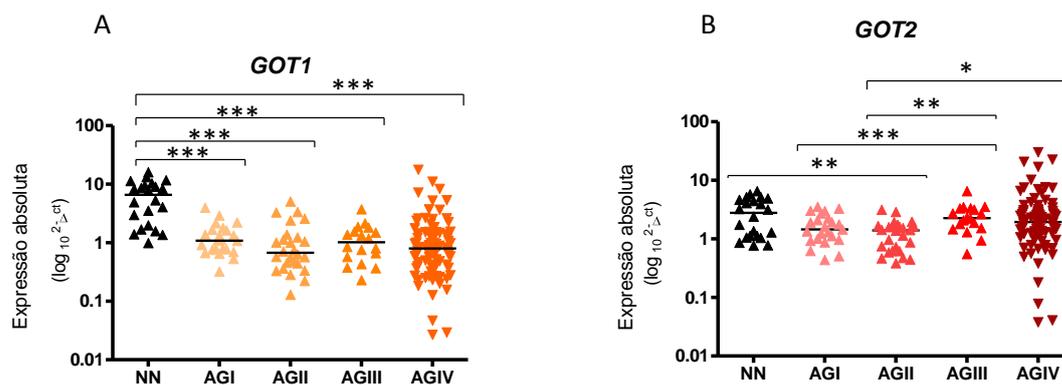


Figura 11. Gráficos de dispersão demonstrando a expressão (ΔCT) de *GOT1* em A e *GOT2* em B de amostras humanas de tecido cerebral não neoplásico (NN), astrocitoma pilocítico (AGI), astrocitoma de baixo grau (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (AGIV). As barras horizontais representam as medianas das expressões em cada grupo de amostras (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$, análise *post-hoc* entre dois grupos pelo teste de *Dunn*).

Glutamato piruvato transaminase (*GPT2*)

O gene *GPT2*, localizado no cromossomo 16q12.1, codifica enzima que catalisa a reação de transaminação reversível para originar glutamato e piruvato. Houve diferença significativa entre os níveis de expressão de RNAm de *GPT2* em astrocitomas de diferentes graus e tecidos NN ($p < 0,000005$, *Kruskal Wallis*). As medianas dos níveis de expressão de *GPT2* dos tecidos NN, AGI, AGII, AGIII e AGIV foram de 0,23, 0,15, 0,49, 0,18, 0,28, respectivamente. As diferenças estatísticas significativas na comparação dos níveis de expressão de *GPT2* entre os grupos de astrocitomas e NN estão demonstradas na Figura 12.

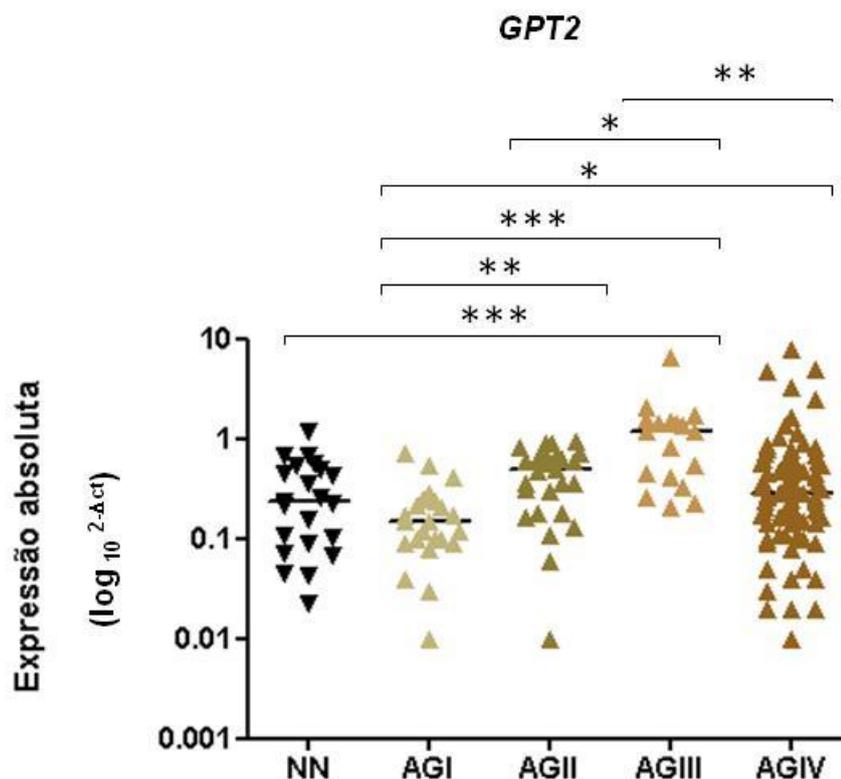


Figura 12. Gráficos de dispersão demonstrando a expressão (ΔCT) de *GPT2* de amostras humanas de tecido cerebral não neoplásico (NN), astrocitoma pilocítico (AGI), astrocitoma de baixo grau (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (AGIV). As barras horizontais representam a mediana das expressões em cada grupo de amostras (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$, análise *pos-hoc* entre dois grupos pelo *Dunn test*).

5.3. Correlações dos níveis das expressões dos genes estudados

Os resultados da análise geral de correlação das expressões entre os genes *ASCT2*, *LAT1*, *GLSISO1*, *GLSISO2*, *GLS*, *GLS2*, *GLUD1*, *GOT1*, *GOT2* e *GPT2*, em diferentes graus de astrocitomas segundo os testes de Spearman ou Pearson estão apresentados a seguir. Os números representam os valores de r e estão grafados em negrito quando foram significativos, com $p < 0,05$. A figura abaixo ilustra o *heatmap* para uma melhor visualização das correlações entre os genes da glutaminólise (Figura 13).

A análise da associação da expressão dos genes da via da glutaminólise aos pares demonstrou um aumento na associação da expressão do *LAT1* com os demais genes de modo crescente com o grau de malignidade. Em AGI, não se observa associação, enquanto que em AGII, *LAT1* associa-se à expressão de *GLS ISO1*, *GLS ISO2*, *GLS*, *GLS2*, *GOT1* e *GOT2*. Já em AGIII, há uma associação adicional à *GPT2*. Em GBM, o nível de associação da expressão de *LAT1* atinge $r > 0,7$ com *GOT2* e *GPT2*.

Astro GI

	ASCT2	LAT1	GLS ISO1	GLS ISO2	GLS	GLS2	GLUD1	GOT1	GOT2	GPT2
ASCT2	1	0.325	0.367*	-0.080	0.084*	0.037	0.534*	0.477*	0.465*	0.589
LAT1		1	0.149	0.057	0.163	0.320	0.457	0.127	0.496	0.399
GLSISO1			1	0.286	0.548	0.534	0.259	0.477	0.417	0.294
GLSISO2				1	0.439	-0.071	-0.107	-0.217	0.104	-0.165
GLS					1	0.402	0.109	0.086	0.249	0.228
GLS2						1	0.212	0.490	0.386	0.346
GLUD1							1	0.625	0.723	0.832
GOT1								1	0.817	0.679
GOT2									1	0.772
GPT2										1

Astro GII

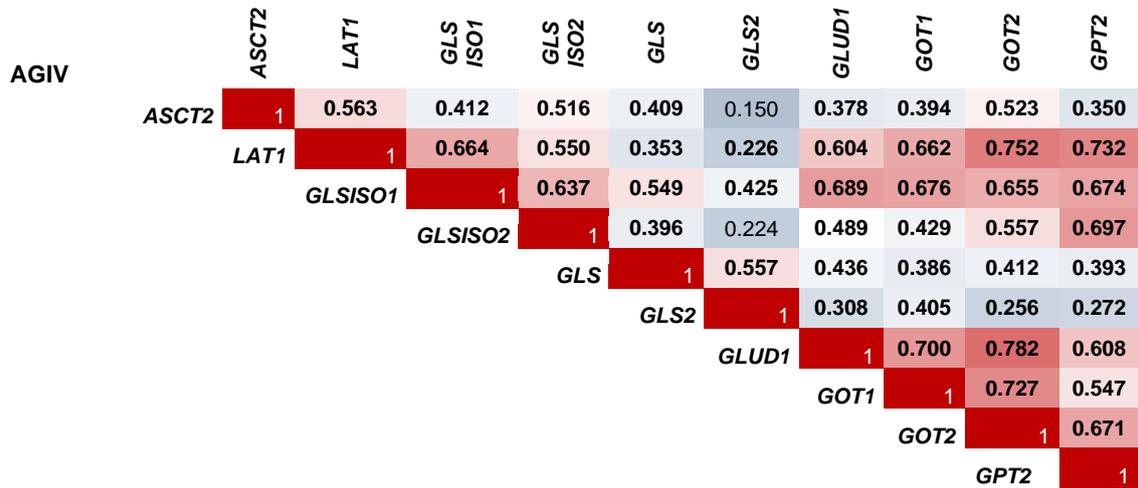
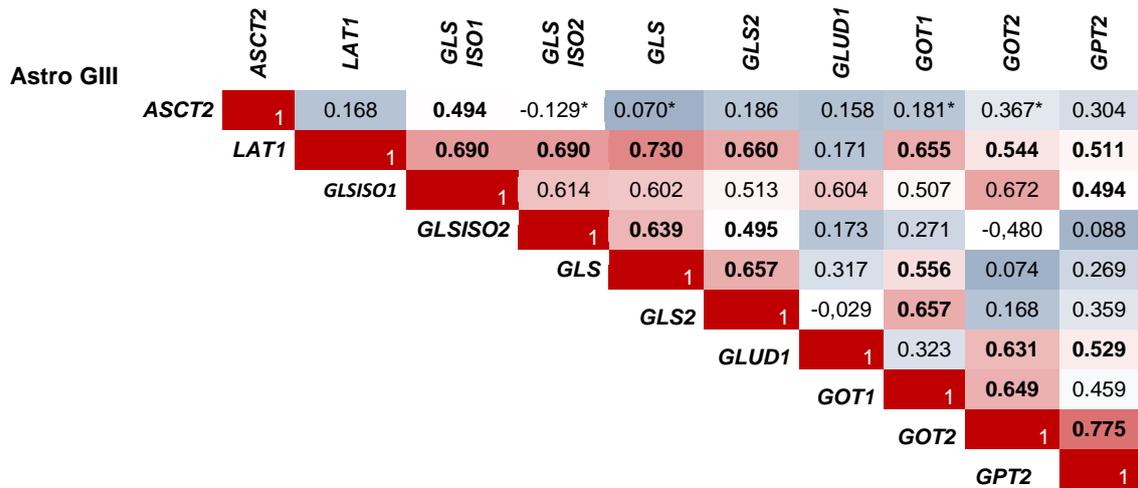
	ASCT2	LAT1	GLS ISO1	GLS ISO2	GLS	GLS2	GLUD1	GOT1	GOT2	GPT2
ASCT2	1	0.168*	0.494	-0.129*	0.070*	0.186*	0.158	0.181	0.367*	0.423*
LAT1		1	0.690	0.690	0.730	0.660	0.171	0.655	0.544	0.356*
GLSISO1			1	0.614	0.602	0.513	0.604	0.507	0.672	-0.228
GLSISO2				1	0.639	0.496	0.173	0.271	-0.048	0.240
GLS					1	0.657	0.317	0.556	0.074	-0.249
GLS2						1	-0.294	0.657	0.168	0.247
GLUD1							1	0.323	0.631	0.482
GOT1								1	0.694	-0.202
GOT2									1	0.129*
GPT2										1

Spearman rho correlation/*Pearson



-0.5 0 1

Negrito: p<0,05



Spearman rho correlation/*Pearson



-0.5 0 1

Negrito: p<0,05

Figura 13. Heatmap mostrando os dados de correlações dos genes da glutaminólise analisadas em AGI, AGII, AGIII e AGIV. A barra de cores à esquerda indica os níveis de correlações (*r*) sendo do azul (correlação inversa ou fraca) até vermelha (correlação forte), em negrito quando p<0,05 e * para correlações de Pearson.

O heatmap com a visão geral das expressões dos genes *ASCT2*, *LAT1*, *GLSISO1*, *GLSISO2*, *GLS*, *GLS2*, *GLUD1*, *GOT1*, *GOT2* e *GPT2* está ilustrado na Figura 14 a seguir.

Observa-se que a ativação da via da glutaminólise, através da hiperexpressão dos genes desta via demonstrada por cores mais avermelhadas, ocorre de modo gradativo, envolvendo maior número de casos e com maiores níveis de expressão entre os astrocitomas de maior grau de malignidade. No entanto, a heterogeneidade nos GBMs é também demonstrada na ativação desta via, uma vez que apenas um subgrupo de GBMs apresenta hiperexpressão destes genes. Torna-se, desta forma, evidente que qualquer abordagem terapêutica almejando-se esta via irá beneficiar apenas um contingente de pacientes, ressaltando a necessidade de uma pré-análise dos alvos para a escolha terapêutica. A necessidade de uma medicina personalizada é corroborada com os presentes achados.

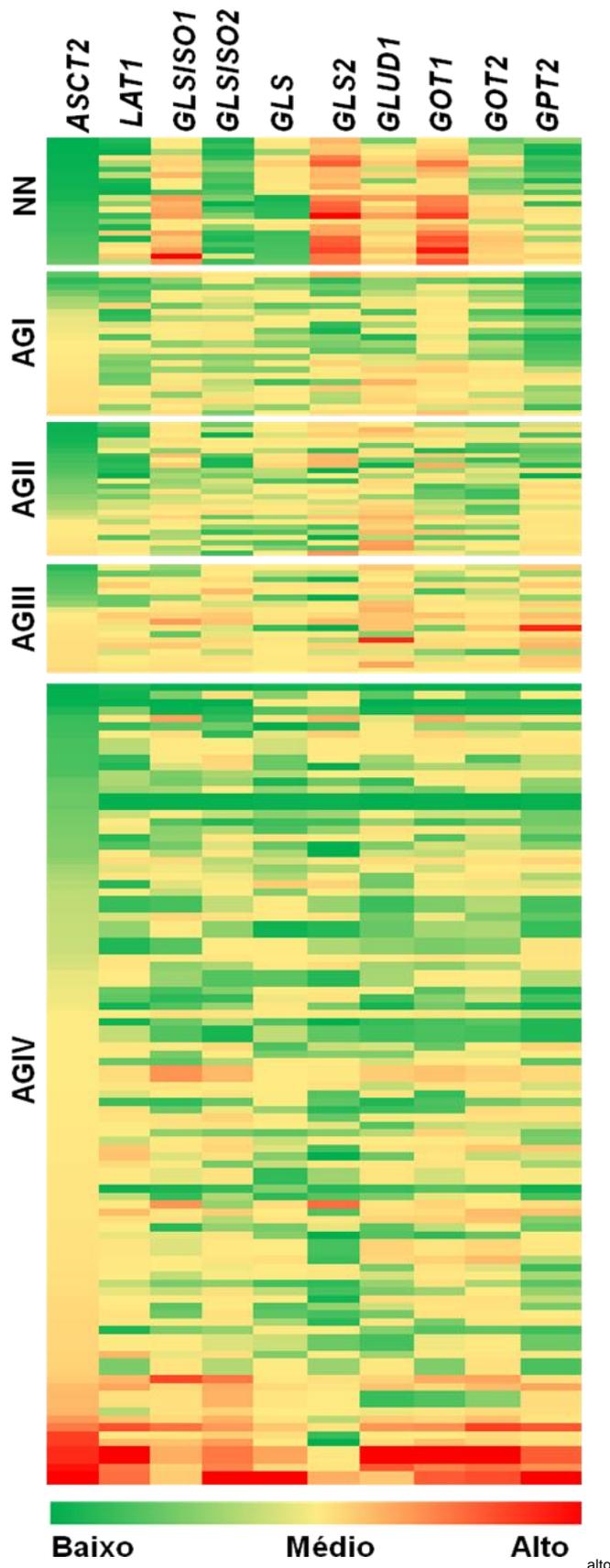


Figura 14. Heatmap da expressão dos genes da glutaminólise nos astrocitomas de diferentes graus.

A barra de cores abaixo indica os níveis de expressão.

NN: não neoplásico,
 AGI: astrocitoma pilocítico,
 AGII: astrocitoma grau II,
 AGIII: astrocitoma grau III e
 GBM: astrocitoma grau IV.

5.4.. Análise de sobrevida – Kaplan Meier

Foram realizadas análises das curvas de sobrevida comparando subgrupos de AGIV com hiperexpressão dos genes (\geq mediana da expressão do gene) e hipoexpressão ($<$ mediana da expressão do gene) de todos os genes incluídos neste presente estudo. Não se observou diferença estatisticamente significativa nos tempos de sobrevida comparando-se estes dois grupos para nenhum dos genes estudados (*log rank* 0,115; 0,186; 0,400; 0,548; 0,899; 0,254; 0,481; 0,810; 0,789; 0,379 respectivamente para *ASCT2*, *LAT1*, *GLSISO1*, *GLSISO2*, *GLS*, *GLS2*, *GOT1*, *GOT2*, *GLUD1* e *GPT2*). A análise do tempo de sobrevida nas diferentes combinações dois a dois dos níveis de expressão dos genes também não demonstrou alterações significativas, exceto para a combinação das expressões de *ASCT2* e *LAT1*. Embora a diferença não tenha alcançado níveis de significância estatística, a hiperexpressão de *LAT1* na presença de hipoexpressão de *ASCT2* determinou uma sobrevida de 6,2 meses, enquanto que os pacientes com GBM apresentando hipoexpressão de ambos os genes apresentou sobrevida de 10,5 meses. Sugerindo que a hiperexpressão de *LAT1* seja um determinante de pior prognóstico (Figura 15).

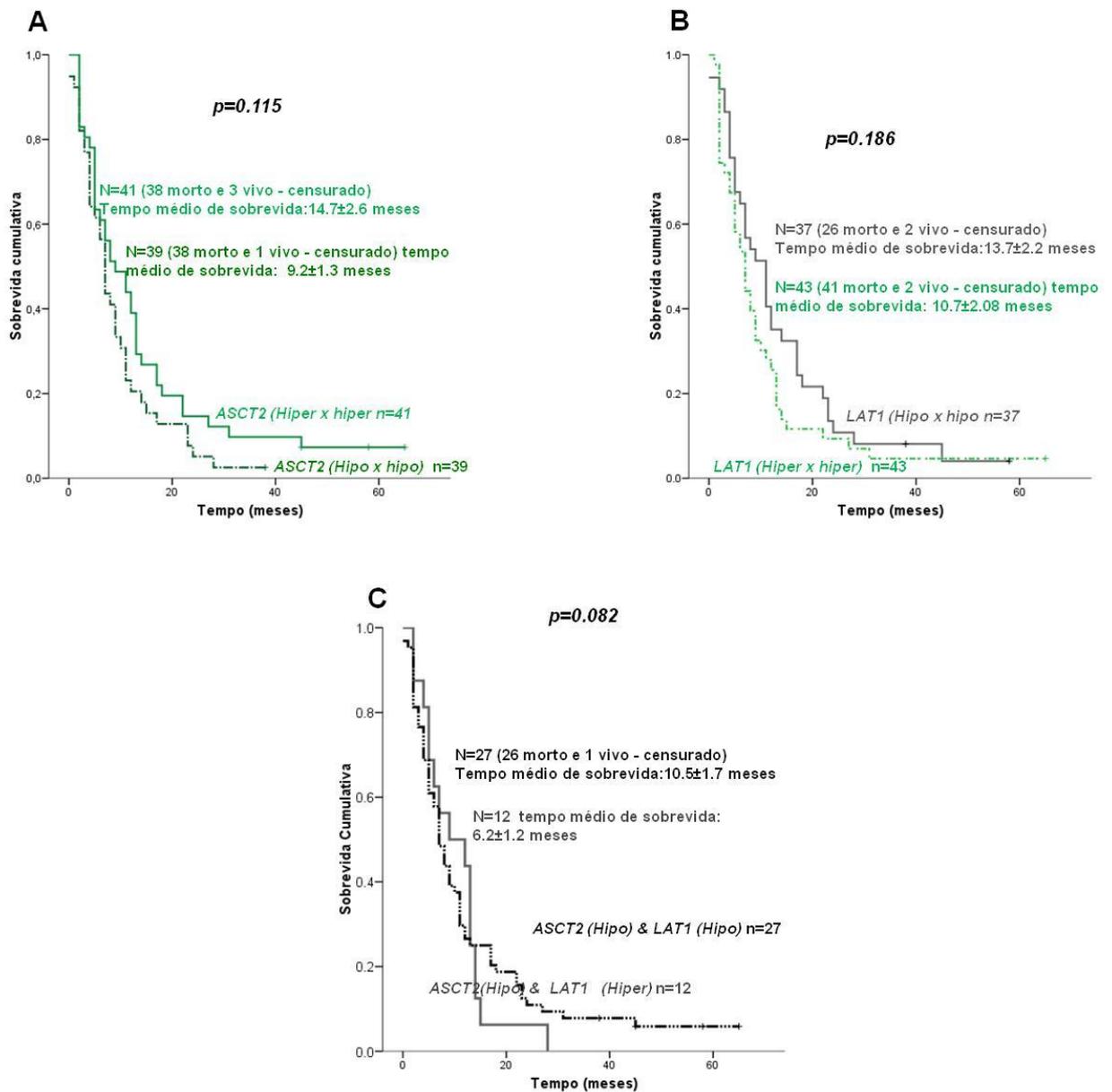


Figura 15. Curvas de sobrevivida dos pacientes com GBM com níveis de expressão de ASCT2 em A e LAT1 em B, em C as combinações de LAT1 hipo e hiperexpressos na presença de ASCT2 hipoexpresso.

6. Discussão

Estudo realizado pelo nosso grupo (R.L. Correia et al., 2010), demonstrou alterações no metabolismo com aumento da via glicolítica, truncagem no CAT e desacoplamento da cadeia respiratória, confirmando o efeito Warburg em astrocitomas de diferentes graus, predominantemente nos GBMs. As hiperexpressões gênicas que foram detectadas de Piruvato quinase 2 (*PKM2*) e lactato desidrogenase A (*LDHA*) indicam o desvio da glicólise para a formação do ácido láctico. Estes resultados prévios do nosso grupo permitiram levantar a hipótese de que a via da glutamina pudesse ser uma via alternativa para produção de substratos bioenergéticos e formação de outras macromoléculas, quando a glicose não é mais suficiente para esta finalidade. Em vários tumores sólidos, as células cancerígenas são forçadas a utilizar substrato energético alternativo, como a oxidação da glutamina (Gln), processo chamado glutaminólise (Rossingnol et al 2004). Dentro deste contexto, o presente estudo tem como proposta a análise da expressão dos genes envolvidos no metabolismo da Gln em astrocitomas e a correlação destas expressões com os graus de malignidade e desfecho clínico de tempo de sobrevida entre os pacientes com GBM.

A Gln fornece importantes substratos para a respiração, bem como nitrogênio para a produção de proteínas, hexosaminas e macromoléculas, sendo um nutriente versátil necessário para a sobrevivência e crescimento de vários tipos de tumores (Hensley et al., 2014) A compreensão do

funcionamento desta via nos ajudará a entender melhor a transformação maligna (Cheng et al., 2010).

O metabolismo em tumores tem sido foco de muitos estudos há aproximadamente 90 anos, desde os experimentos de Otto Warburg, quando foi demonstrada a importância da glicose no crescimento celular. Desde então as investigações do metabolismo energético em tumores têm sido crescentes (DeBerardinis et al., 2007; Fan et al., 2009; Gao et al., 2009; Wise et al., 2008), principalmente em busca de novos agentes terapêuticos para o tratamento do câncer (Thangavelu et al., 2014).

6.1. Transportadores da glutamina

Em nossa casuística os níveis de expressão de *ASCT2* e *LAT1* aumentaram de acordo com a malignidade e apresentaram diferenças significantes em relação ao tecido cerebral não neoplásico. Adicionalmente, observou-se correlações significativas de *ASCT2* e *LAT1* em AGII ($r=0.634$, $p=0.0005$) e AGIV ($r=0.563$, $p<0.0005$). Estes achados corroboram descrições prévias de associação da expressão de *ASCT2* ao fenótipo maligno em carcinoma de mama (Collins et al., 2003). Adicionalmente, há descrição de que a expressão de *ASCT2* conferiu vantagem ao crescimento de adenocarcinoma coloretal, com correlação dos níveis de expressão proteica de *ASCT2* com a agressividade e redução da sobrevida neste tipo de tumor (Witte et al., 2002). Resultados similares foram observados em adenocarcinoma de próstata (Collins et al., 2003). Em tumores cerebrais, descreveu-se expressão diferencial dos transportadores de Gln em astrocitomas graus III e IV, por RT-

PCR (Sidoryk et al., 2004), com confirmação em modelo *in vitro* com células da linhagem C6 derivada de astrocitoma murino (Dolinska et al., 2003), em linhagem derivada de neuroblastoma humano (Wasa et al., 2002) e células derivadas de glioma (Sidoryk et al., 2004). Pressupõe-se que o aumento da expressão de *ASCT2* em astrocitomas anaplásicos e GBM seja decorrente da ativação via oncoproteína Myc. Uma contra-prova do envolvimento do *ASCT2* no crescimento tumoral foi demonstrada pela inibição da captura de Gln e pela inibição da ativação da via mTOR dependente de Gln com o uso do inibidor de *ASCT2*, L- γ -glutamil-p-nitroanilida (GPNA).

Há, igualmente, várias descrições de elevação da expressão de *LAT1* em câncer que corroboram nossos achados de expressão deste transportador, como em carcinoma coloretal (Yanagida et al., 2001 e Wolf et al., 1996), glioma (Nawashiro et al., 2006), carcinoma de esôfago (Kobayashi et al., 2005) e ovário (Kaji et al., 2010).

Quando analisamos o impacto da hipoexpressão ou hiperexpressão separadamente destes dois genes na sobrevida dos pacientes com GBM não observamos diferenças significativas ($p = 0,115$ para *ASCT2* e $p = 0,186$ para *LAT1*). No entanto, a análise das combinações dos níveis de expressão dos dois genes resultou em tempos de sobrevidas menores quando havia hiperexpressão de ambos, e principalmente na presença de hiperexpressão de *LAT1*, embora as diferenças não alcançassem significância estatística, provavelmente pelo restrito número de casos em cada condição. O impacto negativo da hiperexpressão de *LAT1* foi descrita previamente por outros como em carcinoma de próstata (Sakata et al., 2009), adenocarcinoma pulmonar

(Kaira et al., 2009), câncer de pulmão não oat cells (Kaira et al., 2008) e mesmo em astrocitomas (DeBerardinis et al., 2007).

6.2. Conversão da glutamina a glutamato

A glutaminase é a primeira enzima da via da glutaminólise que catalisa a desaminação da Gln para Glu. Observou-se uma diferença relevante nos níveis de expressão dos dois tipos de glutaminase (*GLS* e *GLS2*) nos casos de astrocitomas analisados no presente estudo Figura 9. Enquanto os níveis de expressão de *GLS* nos astrocitomas de diferentes graus não diferiram estatisticamente dos níveis observados em tecidos cerebrais não neoplásicos, os níveis de *GLS2* foram menores em tecidos tumorais do que nos tecidos não neoplásicos, sendo as diferenças significativas para todos os graus de malignidade em comparação ao tecido não neoplásico. A ação supressora de tumor do *GLS2* foi descrita anteriormente por outros (Szeliga et al., 2005, Hu et al., 2010) e demonstrada previamente em estudo *in vitro* na linhagem T98G de glioma, com reversão do fenótipo tumoral com a indução da hiperexpressão de *GLS2* nesta linhagem (Szeliga et al., 2009). Similarmente, observou-se a inibição da proliferação e da migração das células tumorais originárias de GBM e astrocitoma anaplásico com a restauração da expressão de *GLS2* (Ollala et al., 2002). A sua ação anti-tumoral provavelmente é exercida pelo aumento dos níveis celulares de GSH, de stress oxidativo e aumento dos níveis de radicais livres (Lora et al., 2004), sendo esta ação dependente de p53 (Suzuki et al., 2010).

A análise estratificada das expressões das duas isoformas de *GLS* demonstrou que de fato a isoforma 2 apresentava expressão diferencial nos diferentes graus de astrocitomas (Figura 16), apresentando cada um dos graus expressões significativamente maiores em comparação ao tecido não neoplásico, e aumento da expressão em paralelo ao aumento da malignidade.

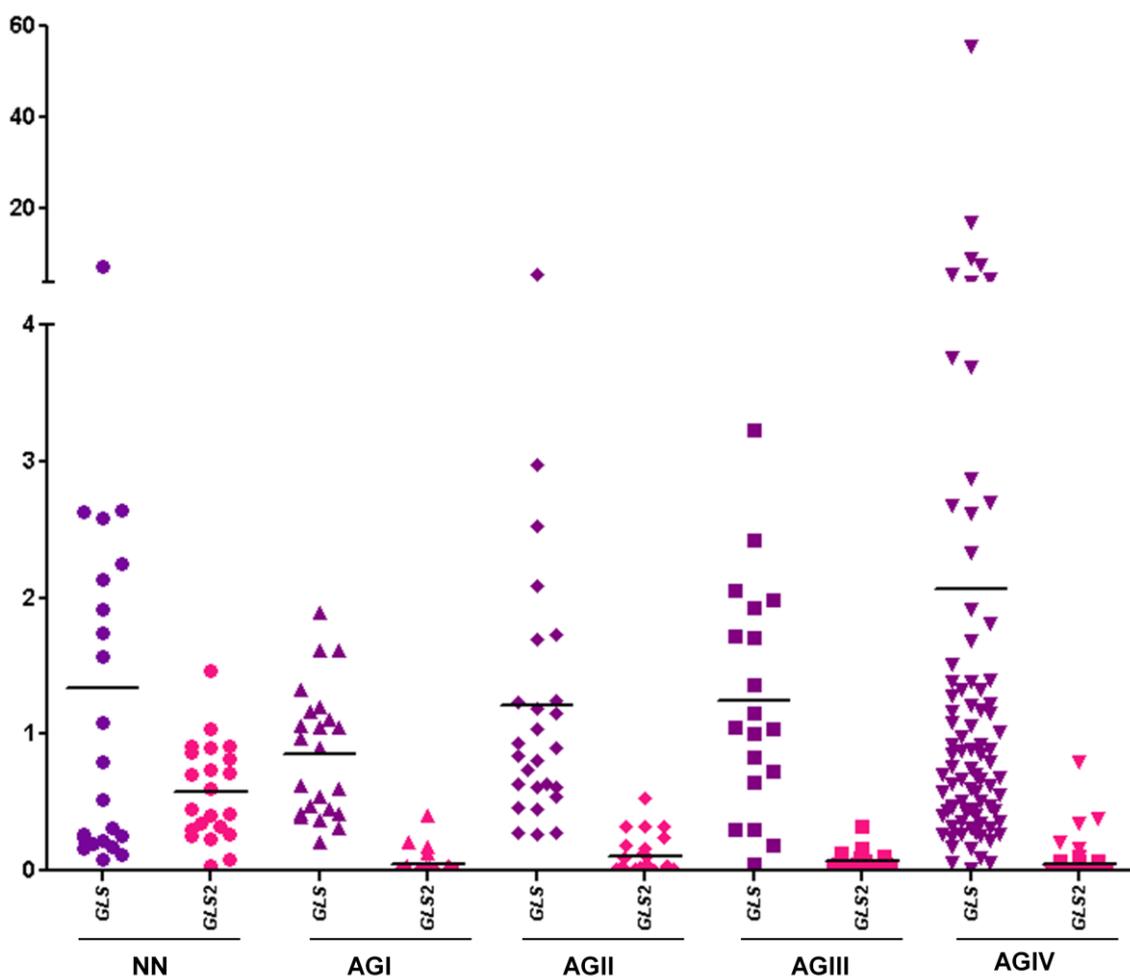


Figura 16. Gráficos de dispersão demonstrando uma visão geral dos níveis de expressão de RNAm de *GLS* e *GLS2*, em amostras humanas de tecido cerebral não neoplásico (NN), astrocitoma pilocítico (AGI), astrocitoma de baixo grau (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (AGIV). As barras horizontais representam as medianas das expressões em cada grupo de amostras.

Em contraste, a isoforma 1 apresentou expressão elevada no tecido cerebral não neoplásico coletado em cirurgia de epilepsia do lobo temporal, um achado dentro do esperado, uma vez que o Glu é neurotransmissor e há uma ativação da via glutamatérgica em epilepsia (Figura 17). Adicionalmente, não se observou alteração significativa da expressão desta isoforma nos diferentes graus de astrocitoma. Pode-se, desta forma, concluir que é a isoforma 2 do *GLS* que desempenha papel na tumorigênese e na progressão maligna dos astrocitomas.

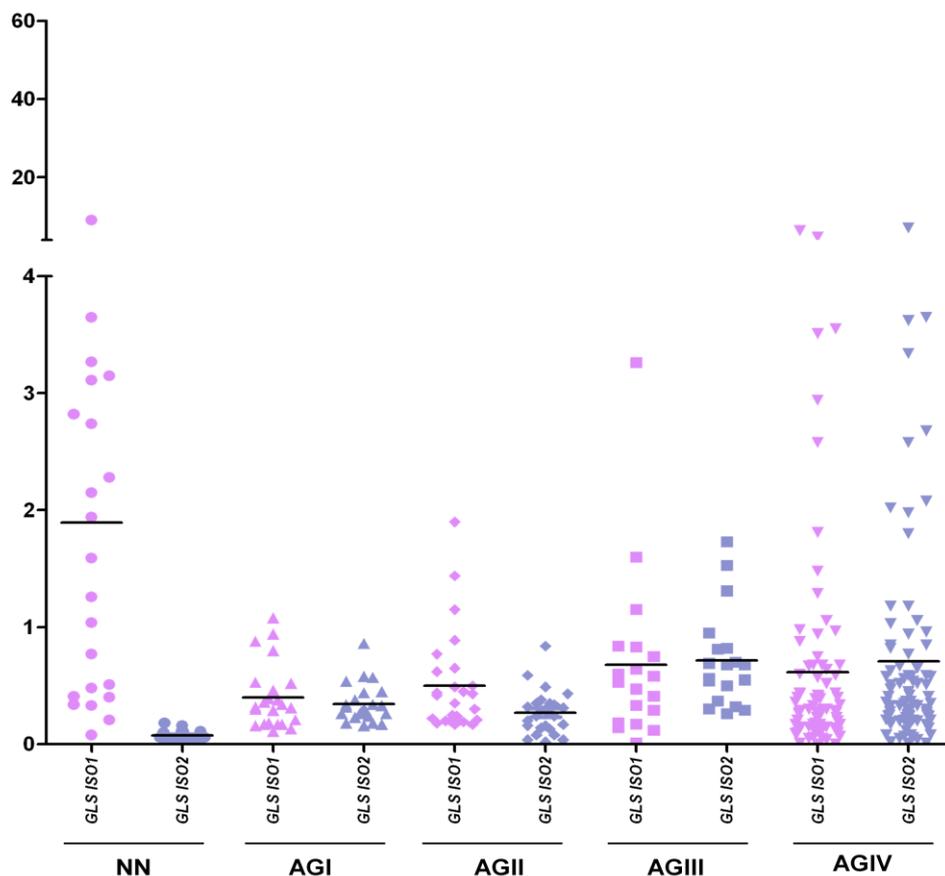


Figura 17. Gráficos de dispersão demonstrando uma visão geral dos níveis de expressão de RNA de *GLS ISO1* e *GLS ISO2* em amostras humanas de tecido cerebral não neoplásico (NN), astrocitoma pilocítico (AGI), astrocitoma de baixo grau (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (AGIV). As barras horizontais representam as medianas das expressões em cada grupo de amostras.

A expressão elevada da isoforma 2 de *GLS* (GAC) já havia sido descrita anteriormente em gliomas (Szeliga et al., 2005 e 2008), também em adenoma/carcinoma coloretal (Tumer & McGivan, 2003) e em linhagens celulares de tumor mamário em comparação às células normais (Elgadi et al., 1999). Interessantemente, esta isoforma localizada na mitocôndria está sujeita às oscilações de concentração de oxigênio, sendo sua expressão maior em condições de hipóxia e ativada por fosfato inorgânico (Cassago et al., 2012). A expressão desta isoforma mitocondrial de *GLS* encontra-se ainda sob a influência do fator de transcrição oncogênico c-Myc, que por sua vez regula miR 7-8 e estimula a proliferação (Gao et al., 2009).

Embora tenham sido observadas expressões diferenciais de *GLS*, na sua isoforma 2 e de *GLS2* entre os astrocitomas de diferentes graus e tecido não neoplásico, não se constatou diferença estatisticamente significativa nos tempos de sobrevida comparando subgrupos de pacientes com GBM apresentando hiperexpressão ou hipoexpressão destes genes, sugerindo que deva haver a concomitância de algum outro fator para o impacto no desfecho clínico de tempo de sobrevida.

6.3. Conversão do glutamato a α -cetoglutarato

A conversão do Glu para α -cetoglutarato, substrato que integra o ciclo de ácidos tricíclicos pode ser realizada por diversas enzimas: glutamato desidrogenase (*GLUD1*) e glutamato transaminases que podem utilizar substratos distintos como oxaloacetato (glutamato oxaloacetato transaminase – *GOT*) e piruvato (glutamato piruvato transaminase – *GPT*).

A maioria das células utilizam GLUD1 para converter Glu derivado de Gln para α -cetogluturato na mitocôndria para abastecer o ciclo do ácido tricarboxílico. No entanto, há descrição recente da utilização de uma via distinta com utilização de aspartato derivado de Gln pelas células do adenocarcinoma ductal pancreático. Nesta via, o aspartato é transportado para o citoplasma onde é convertido em oxaloacetato pelo aspartato transaminase (GOT1). Subsequentemente, o oxaloacetato é convertido em malato e então em piruvato, aumentando a razão NADPH/NADP⁺ com manutenção do estado redox da célula. Esta reprogramação do metabolismo da Gln neste tipo de tumor é mediada pelo oncogene *KRAS* (Son et al., 2013).

Observou-se o aumento dos níveis de expressão de todas as enzimas desta etapa da via da glutaminólise, tanto GLUD1 como ambas as transaminases (GOT e GPT) nas amostras de astrocitomas de diferentes graus de malignidade em comparação ao tecido não neoplásico, sendo as diferenças estatisticamente significativas. Interessantemente, o nível de associação da hiperexpressão entre estes genes mostrou-se significativa, com índice de correlação aumentando conforme o aumento do grau de malignidade. Os maiores índices de correlação foram observados em GBM. Surpreendentemente, índices de correlação comparáveis aos observados em GBM foram detectados em astrocitoma pilocítico (AGI) (Figura 13). A compreensão dos mecanismos de regulação do metabolismo, que levam a um fenótipo tumoral não invasivo, com baixo índice de proliferação (AGI) e outro altamente proliferativo e invasivo (GBM), apesar das semelhanças nas expressões gênicas destas enzimas, permitirá a seleção dos pontos críticos de controle do fenótipo proliferativo e propiciar novas estratégias terapêuticas.

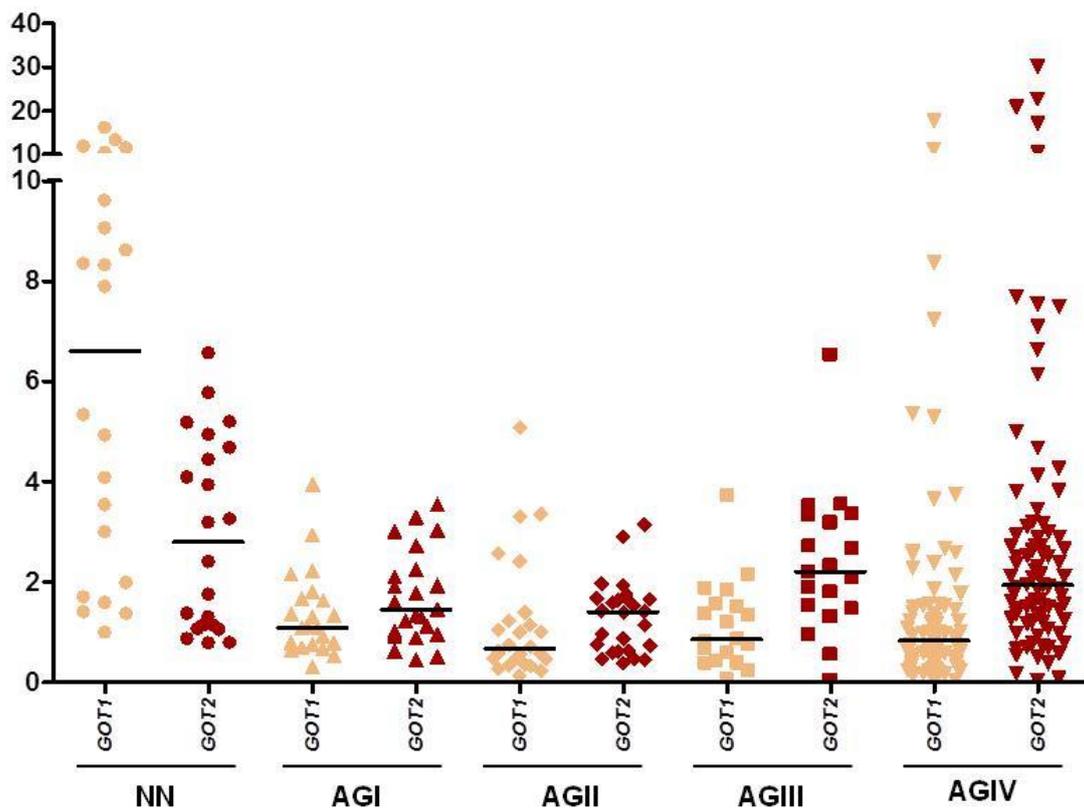


Figura 18. Gráficos de dispersão demonstrando a visão geral dos níveis de expressão de RNA de *GOT1* e *GOT2* em amostras humanas de tecido cerebral não neoplásico (NN), astrocitoma pilocítico (AGI), astrocitoma de baixo grau (AGII), astrocitoma anaplásico (AGIII) e glioblastoma (AGIV). As barras horizontais representam as medianas das expressões em cada grupo de amostras.

Neste contexto, estudo recente *in vitro* em linhagens de carcinoma pancreático demonstrou que o silenciamento de oncogene *KRAS* aumentou a expressão de *GLUD1* e diminuiu de *GOT1*, o que foi confirmado em modelo animal, demonstrando-se que este oncogene desempenha papel crítico na reprogramação do metabolismo da Gln para a manutenção do crescimento e progressão do tumor (Son et al., 2013) Figura 19.

Na nossa atual amostragem de astrocitomas, observou-se hiperexpressão crescente com o grau de malignidade tanto da aspartato transaminase mitocondrial como da citoplasmática (Figura 18).

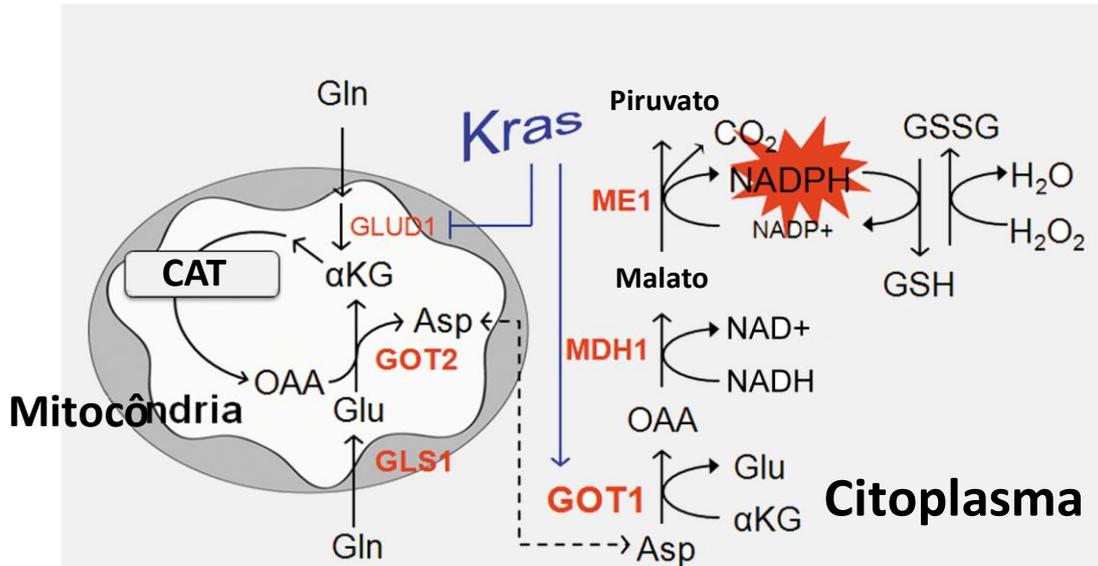


Figura 19: Via mostrando o oncogene *KRAS* reprogramando o metabolismo da Gln para manutenção e crescimento tumoral. Figura adaptada de Son et al., 2013.

A análise conjunta dos níveis de expressão de todos os genes envolvidos na via da glutaminólise permitiu concluir que há uma ativação crescente desta via conforme aumenta a malignidade dos astrocitomas. No entanto, este aumento ocorre de modo contudente em apenas um subgrupo de pacientes com GBM, demonstrando-se mais uma vez que este tipo de tumor é muito heterogêneo. Torna-se evidente de que haverá a necessidade de estudos personalizados do estado de ativação de vias específicas, dos níveis de expressão dos genes e de seu estado mutacional para se aumentar os benefícios terapêuticos para agentes específicos.

A ausência de impacto clínico na análise das hiper ou hipoexpressões destes genes ou da combinação das expressões destes genes sugerem que estes resultados devam ser analisados nas vias de ativação dos oncogenes ou da inibição dos genes supressores. As análises subsequentes dos atuais dados no contexto das alterações de Myc e p53 poderão detalhar melhor as vias de controle da reprogramação metabólica da Gln nos astrocitomas.

7. Conclusões

1. Os resultados prévios de expressão gênica diferencial dos diferentes graus de astrocitomas por *microarray* de oligonucleotídeos permitiram selecionar os genes de interesse relacionados a via da glutaminólise: *ASCT2*, *LAT1*, *GLS*, *GLS2*, *GOT1*, *GOT2*, *GLUD1* e *GPT2*.
2. As diferenças de expressões gênicas de *ASCT2*, *LAT1*, *GLS ISO1*, *GLS ISO2*, *GLUD1*, *GOT1*, *GOT2* e *GPT2* entre as amostras de astrocitomas e de tecidos cerebrais não neoplásicos foram significativas, notando-se um aumento gradativo destas expressões com o aumento da malignidade. Os níveis de expressão de *GLS2* em astrocitomas foram significativamente menores do que nos tecidos cerebrais não neoplásicos, corroborando o seu papel como supressor tumoral. Em contraste as expressões de *GLS ISO2* foram mais elevadas em astrocitomas relativamente aos tecidos cerebrais não neoplásicos confirmando o seu papel na progressão tumoral.
3. As associações das expressões dos genes envolvidos na via da glutaminólise foram mais relevantes e significativas nos astrocitomas de maior malignidade. Entre os genes estudados, a expressão de *LAT1* correlacionou-se com maior frequência e significância com os demais genes. As co-expressões foram mais significativas em GBM, no entanto,

apenas um subgrupo dentre estes pacientes apresentou a hiperexpressão concomitante destes genes, corroborando a presença de heterogeneidade nos GBMs também do ponto de vista metabólico.

4. A hiperexpressão de LAT1, embora sem significância estatística, relacionou-se com menor tempo de sobrevida entre os pacientes com GBM. Os níveis de expressão dos demais genes não causou impacto na sobrevida dos pacientes com GBM, sugerindo a existência de outros fatores concomitantes norteados este impacto.

8. Referências

- Aledo, J. C., Gomez-Fabre, P. M., Olalla, L. & Marquez, J. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mamm Genome*. 2000; 11, 1107–1110.
- Bello MJ, González-Gómez P, Rey JA. Metastasis tumors of the central nervous system: *Neurocirugia (Astur)*. 2004 6:590-5.
- Bjerregaard B, Holck S, Christensen IJ, Larsson LI. Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 16:1906-11.
- Bode BP, Kaminski DL, Souba WW, Li AP. Glutamine transport in isolated human hepatocytes and transformed liver cells. *Hepatology*. 1995; 2:511-20.
- Boza JJ, Moënnos D, Jarret AR, Vuichoud J, Garcia-Ròdenas C, Finot PA, Ballèvre O. Neither glutamine nor arginine supplementation of diets increase glutamine body stores in healthy growing rats. *Clin Nutr*. 2000; 19:319-25.
- Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol*. 2000; 7:3321-9.

-
- Bröer A, Wagner C, Lang F, Bröer S. Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance. *Biochem J.* 2000; 3:705-10.
- Brand K. Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochem J.* 1985; 228:353-61.
- Cassago A, Ferreira APS, Ferreira IM, Fornezari C, Gomes ERM, Greene KS, Pereira HM, Garratt RC, Dias SMG, Ambrosio ALB. Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109:1092-1097.
- Collins CL, Wasa M, Souba WW, Abcouwer SF. Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. *J Cell Physiol* 1998; 176:166–78.
- Correia RL, Oba-Shinjo SM, Uno M, Huang N, Marie SK. Mitochondrial DNA depletion and its correlation with TFAM, TFB1M, TFB2M and POLG in human diffusely infiltrating astrocytomas. *Mitochondrion.* 2011; 11:48-53.
- Chen Jin-Qiang, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 2:370-84.
- Cheng T, DeBerardinis RJ. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene.* 2010; 3:313-24.

-
- Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Ver Nutr.* 1995; 15:133-59
- Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt Júnior PI, Guimarães AR. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32:15-21.
- Dang CV. Glutaminolysis: supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells? *Cell Cycle.* 2010; 19:3884-6.
- DeBerardinis RJ, Cheng T.Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene.* 2010; 29:313-24.
- DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18:54-61.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008; 7:11-20.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:19345-50.
- Devlin M. Thomas. *Manual de Bioquímica com correlações Clínicas.* 5ª edição 2002.
- DeAngelis LM. *N Engl J Med.* Brain tumors. 2001; 2:114-23.

-
- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol.* 2012; 14 5:v1-49.
- Dolinska M, Dybel A, Zablocka B, Albrecht J. Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics. *Neurochem Int.* 2003; 4–5: 501–507.
- Duran Rv., Hall N.M. Glutaminolysis feeds mTORC1. *Cell Cycle.* 2012; 15:11-22.
- Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer.* 1988; 62:2152-65.
- Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science.* 1955; 122:501-14.
- Eagle H, Oyama VI, Levy M, Horton CL, Fleischman R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem.* 1956; 218:607-16.
- Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64:3892-9.
- Elgadi KM, Meguid RA, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol Genomics.* 1999; 2:51-62.

-
- Erbil Y, Oztezcan S, Giris M, Barbaros U, Olgac V, Bilge H. The effect of glutamine on radiation-induced organ damage. *Life Sci.* 2005; 78:376-82.
- Fan, T.W., Lane, A.N., Higashi, R.M., Farag, M.A., Gao, H., Bousamra, M., and Miller, D.M. Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by ¹³C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Mol. Cancer.* 2009; 8, 41.
- Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science.* 1987; 235:1492-5.
- Fomchenko EI, Holland EC. Stem cells and brain cancer. *Exp Cell Res.* 2005; 2:323-9.
- Fuchs BC, Finger RE, Onan MC, Bode BP. ASCT2 silencing regulates mammalian target-of-rapamycin growth and survival signaling in human hepatoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293:C55-63.
- Fuchs BC, Bode BP. Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin Cancer Biol.* 2005; 4:254-66.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007; 21:2683–710.
- Glenn D, Gertrude B. E, Henry S. F., Graham L. C. and Darell D. B. Influence of glutamine on the growth of human glioma and medulloblastoma in culture. *Cancer Research* 1985: 4077; 4081-45.

-
- Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eyk JE, Mendell JT, Dang CV. c-Myc suppression of miR-23 enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009; 458:762-5.
- Gupta N, Miyauchi S, Martindale RG, Herdman AV, Podolsky R, Miyake K, Mager S, Prasad PD, Ganapathy ME, Ganapathy V. Upregulation of the amino acid transporter ATB_{0,+} (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1–2:215–223.
- Gupta N, Prasad PD, Ghamande S, Moore-Martin P, Herdman AV, Martindale RG, Podolsky R, Mager S, Ganapathy ME, Ganapathy V. Upregulation of the amino acid transporter ATB_{0,+} (SLC6A14) in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2006; 1:8–13.
- Hall MN. mTOR-what does it do? *Transplant Proc*. 2008; 40:S5-8.
- Hannanein M, Hoeksema MD, Shiota M, Qian J, Harris BK, Chen H, Clark JE, Alborn WE, Eisemberg R, Massion PP. SLC1A5 mediates glutamine transport required for lung cancer cell growth and survival. *Clin Cancer Res* 2013; 3:560-70.
- Haining Z, Kawai N, Miyake K. Relation of LAT1/4F2hc expression with pathological grade, proliferation and angiogenesis in human gliomas. *BMC Clin Pathol*. 2012; 28:12-4.
- Hawkins DS, Park JR, Thomson BG, Felgenhauer JL, Holcenberg JS, Panosyan EH, Avramis VI. Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with

relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2004; 16:5335-41.

Häussinger D. Shifting of hepatic glutamine balance from uptake to output: role of liver cell heterogeneity. *Nutrition.* 1990; 6:412-3.

Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest.* 2013; 9:3678-84.

Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006; 59:15-26.

Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:7455-60.

Kaji M, Kabir-Salmani M, Anzai N, Jin CJ, Akimoto Y, Horita A, Sakamoto A, Kanai Y, Sakurai H, Iwashita M. Properties of L-type amino acid transporter 1 in epidermal ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2010; 3:329-36.

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Kanai Y, Nakajima T, Mori M. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in stage I pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2009; 1:120–126.

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Tanaka S, Ishizuka T, Kanai Y, Endou H, Nakajima T, Mori M. Prognostic

-
- significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I-III nonsmall cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2008; 4:742–748.
- Kekuda R et al. 1996. Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. *J Biol Chem*. 1996; 31:18657-61.
- Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006; 70:1469-80.
- Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008; 13:472-82.
- Knox WE, Horowitz ML, Friedell GH. The proportionality of glutaminase content to growth rate and morphology of rat neoplasms. *Cancer Res*. 1969; 29:669-80.
- Kondoh N, Imazeki N, Arai M, Hada A, Hatsuse K, Masuto H, Matsubara O, Ohkura S, Yamamoto M. Activation of a system A amino acid transporter, ATA1/SLC38A1, in human hepatocellular carcinoma and preneoplastic liver tissues. *Int J Oncol* 2007; 1:81–87.
- Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest*. 2005; 85:154-9.
- Kobayashi H, Ishii Y, Takayama T. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in esophageal carcinoma. *J Surg Oncol*. 2005; 4:233–238.

-
- Kovacevic Z, McGivan JD. Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol Rev.* 1983; 63:547-605.
- Kovacević Z, Morris HP. The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. *Cancer Res.* 1972; 32:326-33.
- Lee SM, Koh HJ, Park DC, Song BJ, Huh TL, Park JW. Cytosolic NADP(+) - dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32:1185–1196.
- Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez De Castro I, Alonso FJ. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells. *Biochem J.* 2000; 2:257-61.
- Lora J, Alonso FJ, Segura JÁ, Lobo C, Márquez J, Matés JM. Antisense glutaminase inhibition decreases glutathione antioxidant capacity and increases apoptosis in Erlich ascitic tumor cells. *Eur J Biochem* 2004; 271: 4298-306.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007; 114:97-109.
- Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) method. *Methods.* 2001; 25:402-408.

-
- Lazo PA. Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells. *Eur J Biochem.* 1981; 117:19-25.
- Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev.* 1990; 48:297-309.
- Liang Y, Liu J, Feng Z. The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell Biosci.* 2013; 6:3-9.
- Li R, Younes M, Frolov A, Wheeler TM, Scardino P, Ohori M, et al. Expression of neutral amino acid transporter ASCT2 in human prostate. *Anticancer Res* 2003; 23:3413–8.
- Linder-Horowitz M, Knox WE, Morris HP. Glutaminase activities and growth rates of rat hepatomas. *Cancer Res.* 1969; 29:1195-9.
- Mavrothalassitis G, Tzimagiorgis G, Mitsialis A, Zannis V, Plaitakis A, Papamatheakis J, Moschonas N. Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: evidence for a small gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 10:3494-8.
- Marie SKN, Okamoto OK, Uno M, Hasegawa APG, Oba-Shinjo SM, et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int J Cancer.* 2008; 122: 807–815.
- Matés JM, Segura JA, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Márquez J. Glutaminase isoenzymes as key regulators in metabolic and oxidative stress against cancer. *Curr Mol Med.* 2013; 4:514-34.

-
- Matés JM, Segura JA, Campos-Sandoval JA, Lobo C, Alonso L, Alonso FJ, Márquez J. Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41:2051-61.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science.* 2006; 312:1650-3.
- McGivan JD, Bungard CI. The transport of glutamine into mammalian cells. *Front Biosci.* 2007; 12:874-82.
- McKeehan WL. Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol Int Rep.* 1982; 7:635-50.
- Medina MA, Núñez de Castro I. Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. *Int J Biochem.* 1990; 22:681-3.
- Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Márquez J, Rodríguez Quesada A, Núñez de Castro I. Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol Cell Biochem.* 1992; 113:1-15.
- Mohamed A, Deng X, Khuri FR, Owonikoko TK. Altered glutamine metabolism and therapeutic opportunities for lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2014; 15:7-15.
- Nakanishi T, Tamai I. Solute carrier transporters as targets for drug delivery and pharmacological intervention for chemotherapy. *J Pharm Sci.* 2011; 9:3731-50.

-
- Nawashiro H, Otani N, Shinomiya N, Fukui S, Ooigawa H, Shima K, Matsuo H, Kanai Y, Endou H. *Int J Cancer*. L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors. 2006; 3:484-92.
- Newsholme P, Curi R, Gordon S, Newsholme EA. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochem J*. 1986; 239:121-5.
- Newsholme EA, Board M. Application of metabolic-control logic to fuel utilization and its significance in tumor cells. *Adv Enzyme Regul*. 1991; 31:225-46.
- Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C, Myer VE, MacKeigan JP, Porter JA, Wang YK, Cantley LC, Finan PM, Murphy LO. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009; 3:521-34.
- Ollala L, Guitiérrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JÁ, Márquez J, Aledo JC. Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J Biol Chem*. 2002; 277:38939-44.
- Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:764-72.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007; 170:1445-53.
- Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2005; 1:93-108.

-
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004; 64:6892-9.
- Matés JM, Segura JA, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Márquez J. Glutaminase isoenzymes as key regulators in metabolic and oxidative stress against cancer. *Curr Mol Med.* 2013; 13:514-34.
- Mavrothalassitis G, Tzimagiorgis G, Mitsialis A, Zannis V, Plaitakis A, Papamatheakis J, Moschonas N. Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: evidence for a small gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 10:3494-8.
- Miyuki Uno, sueli mieko Oba-Shinjo, Roseli da Silva, Flávio Miura, Carlos Afonso Clara, José Reynaldo Walther de almeida, Suzana M F Malheiros, André Macedo Bianco, Reynaldo Brandt, Guilherme Carvalhal Ribas, Halim Feres, Carlos Dzik, Sérgio Rosemberg, João Norberto Stavale, Manoel Jacobsen teixeira and Suely K N Marie. IDH1 mutations in a Brazilian series of Glioblastoma. *Clinics.* 2011; 66:163–165.
- Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem.* 2000; 275:21797-800.
- Pérez-Gómez C, Campos-Sandoval JÁ, Alonso FJ, Segura JA, Manzanares E, Ruiz-Sánchez P, González ME, Márquez J, Matés JM. Co-expression of

-
- glutaminase K and L isoenzymes in human tumor cells. *Biochem J.* 2005; 386:535-42.
- Portais JC, Voisin P, Merle M, Canioni P. Glucose and glutamine metabolism in C6 glioma cells studied by carbon 13 NMR. *Biochimie.* 1996; 78:155-64.
- Pfaffi MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acid Res.* 2001; 29:2004-2007.
- Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J. Mol. Med.* 2004; 82:656–70.
- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* 1979; 254:2669-76.
- Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 3:985-93.
- Sakata T, Ferdous G, Tsuruta T, Satoh T, Baba S, Muto T, Ueno A, Kanai Y, Endou H, Okayasu I. L-type aminoacid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathol Int.* 2009; 1:7–18.
- Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, Tsukamoto T, Rojas CJ, Slusher BS, Rabinowitz JD, Dang CV, Riggins GJ. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res.* 2010; 22: 8981-7.
- Segura JA, Medina MA, Alonso FJ, Sanchez-Jimenez F, Núñez de Castro I.

- Glycolysis and glutaminolysis in perfused Ehrlich ascites tumour cells. *Cell Biochem Funct.* 1989; 1:7-10.
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 10:721-32.
- Shen H, Damcott C, Shuldiner SR, Chai S, Yang R, Hu H, Gibson Q, Ryan KA, Mitchell BD, Gong DW. Genome-wide association study identifies genetic variants in GOT1 determining serum aspartate aminotransferase levels. *J Hum Genet.* 2011; 56:801-5.
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:6658-63.
- Sidoryk M, Matyja E, Dybel A, Zielinska M, Bogucki J, Jaskólski DJ, Liberski PP, Kowalczyk P, Albrecht J. Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas. *Neuroreport.* 2004; 4:575-8.
- Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera RM, Ferrone CR, Mullarky E, Shyh-Chang N, Kang Y, Fleming JB, Bardeesy N, Asara JM, Haigis MC, DePinho RA, Cantley LC, Kimmelman AC. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature.* 2013; 7443:101-5.
- Souba WW. Glutamine and cancer. *Ann Surg.* 1993; 218:715-28.

-
- Sugawara M, Nakanishi T, Fei Y-J, Martindale RG, Ganapathy ME, Leibach FH, Ganapathy V. Structure and function of ATA3, a new subtype of amino acid transport system A, primarily expressed in the liver and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1–2:7–13.
- Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107 7461–7466.
- Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM, Davis FG. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994. *Neuro Oncol*. 1999; 1:14-25.
- Szeliga M, Sidoryk M, Malyia E, Kowzlczyk P, Albrecht J, Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neurosci Lett* 2005; 374:171-3.
- Szeliga M, Obara-Michlewska M, Matyia E, Lazarczyk M, Lobo C, Hilgier W, Alonso FJ, Márquez J, Albrecht J. TRansfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia* 2009; 57:1014-23.
- Thangavelu K, Chong QY, Low BC, Sivaraman J. Structural Basis for the Active Site Inhibition Mechanism of Human Kidney-Type Glutaminase (KGA). *Sci Rep*. 2014; 4:3827.

-
- Turner A, McGivan JD. Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. *Biochem J.* 2003; 370:403-8.
- Uno M, S.M. Oba-Shinjo, A. Wakamatsu, N. Huang, V. Avancini Ferreira Alves, S. Rosemberg, P.H. Pires de Aguiar¹, C. Leite, F. Miura, R. Marino Junior¹, M. Scaff¹, S.K. Nagahashi-Marie. Association of TP53 mutation, p53 overexpression, and p53 codon 72 polymorphism with susceptibility to apoptosis in adult patients with diffuse astrocytomas. *Int J Biol Markers.* 2006; 21:50-7.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem.* 1996; 25:14883-90.
- van den Heuvel AP, Jing J, Wooster RF, Bachman KE. Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13:1185-94.
- Valente V, Teixeira SA, Neder L, Oswaldo OK, Oba-Shinjo SM, Marie, SKN, Scrideli CA, Paçó-Larson ML, Carlotti Jr. CG. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Molecular Biology*, 2009; 10:17-28.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3:34-46.

-
- Vogelstein b, Kinzler KW. P53 fuction and dysfunction. Cell 1992;70:523-6.
- Vos M,; Adams CH; Victor TC, Van Helden PD. Polymorphisms and mutations found in the regions flanking exons 5 to 8 of the TP53 gene in a population at high risk for esophageal cancer in South Africa. Cancer Genet Cytogenet. 2003; 140:23-30.
- Wasa M, Wang HS, Okada A. Characterization of L-glutamine transport by a human neuroblastoma cell line. Am J Physiol Cell Physiol. 2002; 6:C1246-53.
- Wang JB, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, Wilson KF, Ambrosio AL, Dias SM, Dang CV, Cerione RA. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. cancer Cell. 2010; 3:207-19.
- Weiss MD, Derazi S, Rossignol C, Varoqui H, Erickson JD, Kilberg MS, Anderson KJ. Ontogeny of the neutral amino acid transporter SAT1/ATA1 in rat brain. Dev Brain Res.2003; 2:151–159.
- Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 48:18782-7.
- Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. Trends Biochem Sci. 2010; 35:427-33.

-
- Witte D, Ali N, Carlson N, Younes M. Overexpression of the neutral amino acid transporter ASCT2 in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2002; 22:2555-7.
- Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Role of gemistocytes in astrocytoma progression. *Lab Invest.* 1997; 76:277-84.
- Warburg O. Iron, the oxygen-carrier of respiration-ferment. *Science.* 1925; 61: 575-82.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956; 123(3191):309-14.
- Wolf D, Wang S, Panzica M, Bassily N, Thompson N. Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/ E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: Homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res.* 1996; 21:5012–5022.
- Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J-I, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K-I, Takeda E, Goya T, Endou H. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): Characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 2:291–302.
- Yang RZ, Blaileanu G, Hansen BC, Shuldiner AR, Gong DW. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics.* 2002; 79:445-50.

Yang C, Sudderth J, Dang T, Bachoo RM, McDonald JG, DeBerardinis RJ
Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive
impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res.* 2009;
69:7986-93.

Yu W-I, Cong W-M, Zhang Y, Chen Y, Wang F, Yu G. Overexpression of
ATA1/SLC38A1 predicts future recurrence and death in Chinese patients
with hilar cholangiocarcinoma. *J Surg Res.* 2011; 2:663-8.

Anexo 1. Aprovação de projeto de pesquisa



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/10/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0598/10**, intitulado: "**GLUTAMINÓLISE EM ASTROCITOMAS**" apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**.

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

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

Pesquisador (a) Executante: **Maria José Ferreira Alves**

CAPPesq, 15 de Outubro de 2010

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

Anexo 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Este projeto pode nos ajudar a entender melhor como se desenvolvem os tumores de sistema nervoso central e, assim, tentar encontrar uma possibilidade de um tratamento mais eficaz no futuro. Durante a cirurgia, para a retirada do tumor, um pequeno pedaço deste tumor será enviado para o nosso estudo. Vai ser também coletado uma amostra de sangue para o mesmo estudo. Os desconfortos e riscos esperados são os dos procedimentos anestésicos da cirurgia e da punção de uma veia periférica. Quimioterapia e radioterapia são os procedimentos que poderiam ajudar no tratamento destes indivíduos e serão aplicados quando os médicos acharem necessário. Estamos à disposição para oferecer todas informações sobre este estudo. O paciente tem total liberdade de sair do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga qualquer prejuízo no tratamento. O presente estudo não prevê quaisquer tipo de danos à saúde, decorrentes da pesquisa. Todos os dados do paciente serão mantidos em sigilo e privacidade.

Assinatura do(a) paciente ou Representante Legal: _____

Nome do(a) paciente: _____

RG do Prontuário Médico: _____

Médico Responsável: _____

Anexo 3. Dados clínicos

N	AP	Iniciais	Gênero	Data de Nascimento	Idade (Diagnóstico)	Sobrevida	Time (meses)	Status
108		MMP	M	05/08/1970	31	nd	nd	nd
132		EAO	M	11/10/1949	51	nd	nd	nd
167		EA	M	03/31/1962	39	nd	nd	nd
173		MIM	F	10/04/1957	44	nd	nd	nd
179		ED	F	03/21/1962	39	nd	nd	nd
189		RLG	F	06/15/1966	35	nd	nd	nd
196		IG	F	08/15/1957	44	nd	nd	nd
226		PST	M	06/25/1963	38	nd	nd	nd
232		FPB	M	10/08/1973	28	nd	nd	nd
237		AML	F	09/08/1954	47	nd	nd	nd
245		GVA	M	06/25/1976	25	nd	nd	nd
263		MML	M	12/10/1974	27	nd	nd	nd
312		MCL	F	05/18/1961	41	nd	nd	nd
330		JMR	M	02/14/1970	32	nd	nd	nd
332		MSM	F	03/07/1979	32	nd	nd	nd
349		AGCC	M	12/26/1961	40	nd	nd	nd
714		VLPM	F	06/04/1947	56	nd	nd	nd
755		SVSB	F	07/14/1964	39	nd	nd	nd
805		SAD	F	10/14/1966	37	nd	nd	nd
861		RM	M	04/01/1969	35	nd	nd	nd
929		EPAI	F	02/26/1960	45	nd	nd	nd
969		GC	F	02/28/1971	34	nd	nd	nd
185		APF	M	10/11/1977	24	nd	37	0
335		MI	F	11/15/1967	34	nd	89	0
352		JRS	M	09/28/1966	35	nd	68	0
363		RFC	M	04/20/1989	13	nd	nd	nd
421		IAPV	F	03/09/1989	16	nd	nd	nd
436		WGG	M	01/09/1985	18	nd	84	0
463		SEM	F	07/07/1986	16	nd	79	0
495		ASJM	F	10/16/1994	8	nd	nd	nd
501		RJB	M	03/18/1971	32	nd	5	0
570		KBRP	F	04/05/1995	8	nd	nd	nd
594		JCFS	M	06/13/1985	18	nd	nd	nd
601		JJS	M	07/26/1982	21	nd	nd	nd
828		WHO	M	06/21/1988	16	nd	nd	nd
878		JBS	F	11/02/1986	18	nd	nd	nd
889		WAD	F	05/27/1961	43	nd	63	0
892		RAR	M	01/01/1990	14	nd	nd	nd
932		JSO	M	04/13/1987	17	nd	nd	nd
946		PRTS	M	11/06/1995	9	nd	nd	nd
995		JTAN	M	01/14/1983	22	nd	nd	nd
1000		DSS	M	09/10/2000	4	nd	nd	nd
1044		LRR	M	10/28/1996	8	nd	49	0
1049		AOS	F	09/18/1991	14	nd	46	0
1058		RLS	M	02/07/1983	22	nd	nd	nd

Anexo 3. Dados clínicos – Continuação

N	AP	Iniciais	Gênero	Data de Nascimento	Idade (Diagnóstico)	Sobrevida	Time (meses)	Status
55		MAP	F	03/21/1964	36	nd	114	0
76		ML	M	12/04/1973	27	4a 8m	56	1
101		JNO	F	10/25/1977	23	nd	82	0
118		AMC	F	08/02/1955	45	nd	24	1
239		JRA	M	07/25/1945	56	nd	91	0
250		MBC	F	08/25/1971	30	nd	13	1
254		MGSJ	F	06/10/1977	24	nd	27	0
267		AMM	M	09/13/1958	43	nd	96	0
328		CHR	M	04/18/1963	39	nd	91	0
341		ML	M	12/04/1973	28	nd	56	1
346		RTP	M	06/03/1979	23	4a 3m	51	1
392		ARVA	F	05/09/1964	38	nd	80	0
412		AMM	M	09/13/1958	44	nd	96	0
452	AGII	MRS	M	11/15/1961	41	7a	84	1
453		JOJ	M	12/23/1974	28	nd	44	0
467		MAM	F	10/25/1961	41	nd	41	1
490		NNS	M	06/20/1967	35	3a 2m	38	1
577		RNN	F	08/10/1967	35	nd	50	0
715		AOE	F	10/26/1976	27	nd	9	1
806		ESM	M	02/08/1965	39	nd	44	0
999		JWMS	M	08/19/1979	25	nd	60	0
1016		ES	M	08/12/1969	35	nd	23	0
1095		JPS	M	12/08/1973	32	nd	53	0
1099		MGSA	F	03/06/1973	32	nd	52	0
1113		MRS	M	11/15/1961	41	nd	84	1
1155		JSA	F	07/13/1981	25	3a 7m	43	1
28		GAB	M	06/27/1947	54	nd	99	0
34		MG CJ	M	09/06/1982	18	nd	115	0
73		MCV	F	04/08/1976	25	6a 5m	77	1
233		OAA	F	12/07/1943	58	1a 1m	13	1
249		AC	M	12/27/1969	32	0a 7m	7	1
338		LKH	F	01/21/1965	37	1a 2m	14	1
347		WCS	M	04/20/1987	15	nd	82	0
360		ICVK	F	07/04/1970	32	nd	90	0
366		GPJ	M	08/25/1965	37	nd	93	0
410	AGIII	AAS	M	08/04/1972	30	nd	77	0
428		FCRN	M	01/24/1945	58	nd	74	0
478		ASM	M	11/12/1964	39	1a 9m	21	1
514		LFF	M	11/10/1965	37	nd	24	0
734		JRS	M	07/14/1972	31	nd	1	0
905		MGSJ	F	06/18/1977	27	nd	1	0
981		VG CJ	M	02/08/1984	21	nd	nd	nd
1033		ANS	F	06/02/1976	29	nd	2	0
1036		MDDT	F	07/19/1959	46	0a 3m	3	1

Anexo 3. Dados clínicos – Continuação

N	AP	Iniciais	Gênero	Data de Nascimento	Idade (Diagnóstico)	Sobrevida	Time (meses)	Status
35		MPS	M	11/25/1947	53	3a 9m	45	1
74		UC	M	10/25/1926	74	1a 5m	17	1
175		MTC	F	04/07/1945	56	0a 5m	5	1
194		OB	M	05/29/1930	71	1a 10m	22	1
204		BL	F	01/01/1930	70	0a 7m	7	1
208		EFC	M	09/08/1939	62	0a 6m	6	1
256		CDS	M	11/05/1960	41	0a 2m	2	1
269		ELAD	F	01/28/1937	65	0a 0m	0	1
274		BCJ	F	12/20/1954	47	1a 5m	17	1
297		MCE	F	06/14/1923	78	0a 11m	11	1
317		MJO	F	12/22/1930	71	0a 2m	2	1
356		JS	M	06/17/1928	74	0a 11m	11	1
370		WAS	M	07/12/1957	45	1a 1m	13	1
384		CSS	M	04/27/1957	45	1a 2m	14	1
391		IPP	F	03/16/1948	54	1a 0m	12	1
397		MCS	F	12/08/1943	58	0a 5m	5	1
405		WAS	M	07/12/1957	45	1a 1m	13	1
427		AJS	F	11/11/1951	51	0a 5m	5	1
442		MSS	M	05/12/1934	68	0a 4m	4	1
450		CMT	F	08/26/1941	61	1a 2m	14	1
458		MAA	M	03/23/1942	62	0a 3m	3	1
485	AGIV	ASS	M	02/18/1936	67	0a 6m	6	1
496		SASC	F	10/30/1945	57	0a 8m	8	1
498		GP	F	02/06/1986	17	3a 2m	38	1
503		JRF	M	07/17/1939	63	0a 2m	2	1
510		VRS	M	10/11/1946	56	1a 11m	23	1
522		MFC	M	05/20/1955	48	2a 0m	24	1
524		ZFR	F	11/05/1943	59	0a 8m	8	1
547		AA	M	08/15/1931	71	1a 1m	13	1
555		ADM	M	07/20/1946	57	1a 6m	18	1
573		EM	M	11/14/1952	50	0a 9m	9	1
592		MRKMB	F	10/01/1962	40	nd	96	0
629		JLS	M	06/25/1939	64	1a 2m	14	1
632		VAP	F	08/15/1962	41	2a 4m	28	1
638		VFC	M	03/12/1956	55	0a 2m	2	1
640		LPS	F	12/12/1944	58	0a 5m	5	1
642		NDT	M	12/18/1960	42	1a 5m	17	1
663		AFP	M	11/12/1937	66	0a 7m	7	1
684		ADM	F	12/15/1947	56	0a 3m	1	1
687		LZ	M	03/07/1958	45	0a 10m	9	1
698		ERL	M	09/25/1945	58	0a 9m	7	1
724	ACIF	F	02/01/1943	62	0	0	1	
743	JPP	M	06/09/1952	52	0a 2m	2	1	
750	NR	M	09/23/1952	51	0a 6m	6	1	

Anexo 3. Dados clínicos – Continuação

N	AP	Iniciais	Gênero	Data de Nascimento	Idade (Diagnóstico)	Sobrevida	Time (meses)	Status
792		IS	M	12/21/1969	35	0a 5m	5	1
795		JCN	M	06/15/1965	39	0a 11m	11	1
852		AG	M	08/18/1944	60	1a 1m	13	1
854		GFS	M	06/17/1958	46	nd	65	0
875		IS	M	12/21/1969	35	0a 5m	5	1
879		AM	M	07/27/1943	61	0a 3m	3	1
881		JBF	M	01/25/1955	49	0a 4m	4	1
884		ILR	F	01/15/1952	52	2a 3m	27	1
885		MCG	F	04/24/2018	86	0a 2m	2	1
891		FD	M	10/25/1947	57	0a 7m	7	1
901		GMS	M	11/07/1988	16	0a 2m	2	1
903		GSS	M	02/08/1949	55	1a 10m	22	1
925		PMO	M	09/08/1964	40	1a 0m	12	1
930		ASA	M	01/10/1978	26	5a 6m	66	1
1002		MMC	M	01/29/1965	40	0a 2m	2	1
1003		DGS	F	03/25/1937	68	0a 4m	4	1
1007		MGSJ	F	06/18/1977	28	3a 8m	44	1
1009		MAPL	F	10/25/1966	38	1a 9m	21	1
1070		MR	M	03/09/1933	72	0a 8m	8	1
1074		ILO	M	07/25/1973	32	nd	58	0
1077	AGIV	VAP	F	08/15/1962	41	nd	nd	nd
1084		AJ	M	04/18/1951	54	0a 5m	5	1
1091		WJGS	M	05/09/1949	55	1a 11m	23	1
1103		AJ	M	04/18/1951	54	0a 5m	5	1
1118		APS	F	07/10/1945	61	0a 2m	2	1
1122		AF	M	07/26/1937	68	0a 5m	5	1
1123		EFS	M	12/29/1953	52	0a 11m	11	1
1124		AE	M	03/19/1943	63	0a 4m	4	1
1133		FCC	M	12/28/1953	52	0a 9m	9	1
1144		SRS	M	08/15/1929	76	0a 2m	2	1
1161		GFS	M	01/13/1967	39	1a 3m	13	1
1162		MÊS	F	05/20/1938	68	1a 4m	15	1
1169		VMSB	F	03/13/1950	56	1a 4m	2	1
1190		ESB	F	09/16/1948	58	1a 2m	9	1
1194		ASA	M	01/10/1978	26	nd	nd	nd
1199		FRN	M	11/06/1975	30	0a 11m	11	1
1205		OLAN	M	12/13/1936	69	nd	38	0
1212		FRN	M	11/06/1975	30	0a 11m	11	1
1232		FBS	M	04/07/1948	58	1a 0m	12	1
1237		APN	M	05/18/1947	59	0a 7m	7	1
1243		VCT	M	09/22/1959	47	0a 10m	10	1
1250		MFL	M	01/11/1944	63	0a 7m	7	1

Legenda: N: número do caso; AP: Anatomopatológico; NN: não neoplásico; AGI: Astrocitoma pilocítico; AGII: Astrocitoma de baixo grau; AGIII: Astrocitoma anaplásico; AGIV; Glioblastoma; nd: não dispõe de dado;

Anexo 4. Dados de expressão gênica

N	AP	Normalizadores														
		ASCT2	LAT1	GLSISO1	GLSISO2	GLS1	GLS2	GLUD1	GOT1	GOT2	GPT2	TBP	HPRT	GUS-b	Médias Cts	
167	NN	0.02	0.04	0.41	0.04	1.74	0.35	2.07	0.99	0.78	0.22	28.36	22.68	24.48	24.98	
245		0.03	0.02	0.34	0.06	1.57	0.23	4.02	1.69	1.06	0.04	27.66	23.93	25.02	25.57	
237		0.03	0.00	0.21	0.04	0.52	0.25	5.18	2.99	1.04	0.02	25.37	21.75	24.39	23.95	
108		0.04	0.81	1.04	0.05	2.58	0.71	8.91	4.07	2.40	0.10	28.15	24.35	26.16	26.30	
226		0.04	0.23	1.26	0.09	7.56	0.90	13.30	9.05	4.43	0.07	25.97	21.44	22.39	23.36	
232		0.05	0.08	0.77	0.11	2.25	0.30	3.52	5.32	1.13	0.09	28.07	22.96	25.39	25.40	
189		0.06	0.25	2.15	0.07	2.63	0.33	9.94	3.53	1.36	0.16	27.91	24.45	25.61	25.96	
173		0.07	0.04	0.33	0.07	2.14	0.27	2.18	1.36	0.77	0.04	25.78	21.99	24.35	24.14	
179		0.07	0.02	0.40	0.06	1.92	0.41	5.00	1.58	0.86	0.26	27.11	22.57	24.73	24.83	
263		0.08	0.01	0.08	0.07	0.80	0.04	7.89	1.40	1.13	0.11	26.76	22.51	22.5	23.84	
332		0.08	0.27	3.27	0.10	0.08	0.60	25.45	8.31	3.18	0.49	27.23	23.54	25.25	25.37	
330		0.12	0.17	2.28	0.02	0.12	0.82	6.82	8.34	3.25	0.07	29.08	27.11	28.08	28.22	
929		0.16	0.38	2.74	0.07	0.16	0.91	13.97	9.60	4.67	0.67	28.45	25.9	27.5	27.31	
312		0.17	0.07	3.11	0.11	0.17	1.47	25.20	13.23	4.08	0.46	27.22	24.1	24.7	25.40	
132		0.17	0.18	0.51	0.18	1.08	0.08	8.27	1.98	1.29	0.43	28.63	28	27.5	28.04	
196		0.18	0.04	0.48	0.11	2.64	0.42	4.14	4.92	1.74	0.23	29.85	26.9	26.2	27.59	
755		0.20	1.78	2.82	0.05	0.20	0.45	12.44	8.61	4.93	0.55	27.42	25	25.3	25.93	
714		0.22	0.02	1.59	0.04	0.22	0.87	6.38	11.69	6.56	0.23	26.99	24.5	24.9	25.52	
805		0.24	0.86	1.94	0.07	0.24	0.91	10.14	10.31	5.76	0.69	26.62	24.2	24.5	25.26	
861		0.25	0.38	3.15	0.04	0.25	1.04	16.35	16.07	5.17	0.35	26.43	24.7	25.4	25.46	
349		0.27	1.85	9.08	0.16	0.27	0.72	6.10	7.88	3.93	1.21	27.48	25.5	25.4	26.16	
969		0.31	0.24	3.65	0.06	0.31	0.74	12.97	11.37	5.19	0.56	27.25	24.8	25.3	25.83	
1049		AGI	0.27	1.06	1.08	0.44	1.62	0.40	9.26	2.23	2.73	0.17	27.01	26.24	25.02	26.20
495			0.14	0.06	0.17	0.38	0.37	0.00	2.45	0.32	0.51	0.03	27.17	25.03	23.09	25.19
889			0.24	0.13	0.11	0.17	0.54	0.01	2.50	1.08	1.61	0.08	27.42	26.78	25.06	26.44
352			0.36	0.09	0.36	0.45	1.05	0.00	3.32	0.67	0.96	0.10	29.69	26.06	23.88	26.53
335	0.48		0.14	0.32	0.30	1.20	0.03	4.15	0.79	1.23	0.10	28.30	27.92	25.74	27.34	
828	0.50		1.55	0.13	0.26	0.31	0.01	7.40	1.31	1.93	0.15	29.43	27.35	26.06	27.53	
594	0.63		0.05	0.53	0.34	0.63	0.03	1.35	1.12	0.62	0.01	26.51	25.72	24.02	25.58	
932	0.67		0.07	0.21	0.26	0.90	0.04	6.10	0.80	0.93	0.15	26.56	25.68	23.77	25.29	
601	0.68		0.28	0.38	0.54	1.33	0.00	2.90	1.33	2.25	0.22	27.19	24.30	24.05	25.08	
878	0.69		0.46	0.31	0.34	0.39	0.00	4.59	0.92	1.01	0.12	28.82	26.50	24.55	26.58	
463	0.71		0.10	0.30	0.57	0.60	0.01	0.58	0.69	0.44	0.04	27.02	24.49	23.87	25.24	
892	0.78		0.37	0.17	0.24	0.42	0.01	2.74	1.08	1.30	0.09	26.05	26.12	24.90	25.80	
363	0.79		0.30	0.34	0.58	1.89	0.01	1.87	0.76	1.12	0.10	28.19	26.12	23.96	26.13	
946	0.98		0.19	0.16	0.18	0.42	0.02	3.83	0.53	0.88	0.12	25.23	25.05	23.31	24.64	
501	1.04		0.15	0.52	0.23	1.11	0.17	4.03	2.16	1.91	0.17	25.68	26.01	24.35	25.45	
995	1.06		0.18	0.18	0.18	0.45	0.03	11.62	2.93	3.04	0.28	27.20	25.62	24.10	25.67	
1000	1.26		0.14	0.46	0.33	1.05	0.04	6.99	1.37	3.01	0.72	26.35	26.04	24.29	25.70	
185	1.30		0.15	0.29	0.26	0.21	0.01	19.58	1.80	1.77	0.41	25.85	25.03	23.16	24.79	
1044	1.46		0.45	0.88	0.28	1.06	0.21	8.37	1.63	2.10	0.21	26.22	25.27	25.52	25.60	
570	1.52		0.87	0.17	0.32	1.61	0.01	8.89	0.77	1.34	0.25	28.73	28.46	26.14	27.98	
436	1.52		0.44	0.80	0.86	1.17	0.01	10.79	1.66	3.55	0.24	27.52	26.30	26.39	26.78	
421	1.70		0.18	0.39	0.28	0.48	0.02	4.84	0.65	1.45	0.09	26.18	24.61	24.51	25.16	
1058	2.10		0.27	0.94	0.16	0.97	0.13	9.27	3.95	3.29	0.54	26.36	26.11	24.26	25.66	

Anexo 4. Dados de expressão gênica – Continuação

N	AP											Normalizadores				
		ASCT2	LAT1	GLIS01	GLIS02	GLS1	GLS2	GLUD1	GOT1	GOT2	GPT2	TBP	HPRT	GUS-b	Médias Cts	
467	AGII	0.06	0.11	0.49	0.16	1.23	0.16	4.44	0.44	0.75	0.30	25.94	25.43	23.97	25.28	
806		0.06	0.06	0.62	0.29	1.04	0.10	18.49	1.39	1.63	0.72	26.25	26.87	25.27	26.21	
392		0.07	0.04	0.45	0.02	0.74	0.19	12.41	2.41	1.65	0.11	26.33	27.18	24.46	26.09	
118		0.07	0.27	0.89	0.35	2.09	0.03	6.05	0.74	1.67	0.65	29.56	28.99	27.83	28.92	
346		0.11	0.26	0.50	0.35	1.15	0.04	2.08	1.00	0.59	0.18	26.20	26.97	24.91	26.07	
490		0.14	0.32	0.17	0.59	0.61	0.00	7.19	0.13	0.45	0.13	28.21	25.32	26.36	26.60	
250		0.19	0.07	1.90	0.13	2.53	0.32	7.23	3.30	3.15	0.16	27.35	27.18	25.67	26.93	
267		0.21	0.04	0.35	0.04	2.98	0.33	2.07	0.46	0.38	0.18	26.11	25.30	25.79	25.79	
328		0.23	0.06	1.44	0.04	5.62	0.33	0.19	5.08	1.14	0.06	27.49	24.09	26.78	25.98	
453		0.25	0.05	0.17	0.24	0.64	0.00	7.39	0.48	1.62	0.81	26.62	26.51	25.32	26.13	
55		0.29	0.00	0.20	0.17	0.61	0.02	2.94	1.05	1.39	0.01	27.18	25.57	24.75	25.78	
239		0.34	0.37	0.18	0.30	0.27	0.00	8.42	0.71	1.53	0.35	26.76	25.53	26.00	26.17	
577		0.36	0.10	0.20	0.27	1.25	0.02	8.49	0.22	0.87	0.91	32.23	29.02	26.64	29.28	
999		0.37	0.23	0.77	0.24	0.93	0.13	4.68	0.33	0.47	0.48	26.64	26.33	24.67	26.04	
254		0.42	0.15	0.24	0.43	0.64	0.02	2.74	0.34	0.47	0.94	27.77	28.75	27.42	28.05	
76		0.46	0.28	0.25	0.31	0.81	0.01	8.14	0.57	1.41	0.36	24.88	24.62	24.96	24.83	
341		0.47	0.27	0.65	0.49	1.73	0.09	11.01	0.63	0.62	0.31	27.51	26.45	24.47	26.14	
101		0.56	0.44	0.44	0.84	1.70	0.01	13.19	0.57	0.73	0.50	27.06	26.73	24.90	26.31	
1155		0.62	0.28	1.15	0.14	0.54	0.24	18.99	2.57	1.93	0.60	31.42	27.88	27.36	28.77	
452		0.72	0.23	0.42	0.34	0.84	0.03	13.75	1.01	1.59	0.63	29.43	28.56	28.01	28.68	
1113		0.73	0.68	0.30	0.20	0.45	0.00	11.08	0.36	0.97	0.58	25.74	25.46	24.89	25.40	
1016		0.82	0.46	0.20	0.08	0.28	0.01	17.99	3.35	2.90	0.57	26.89	27.10	26.14	26.68	
412		1.02	0.11	0.21	0.38	0.90	0.00	3.23	0.28	0.62	0.36	25.75	26.94	25.48	26.15	
1099		1.17	0.40	0.43	0.16	0.28	0.03	24.26	1.23	1.75	0.73	26.69	26.03	26.55	26.49	
1095		1.27	0.64	0.19	0.32	0.46	0.00	26.35	0.56	1.97	0.89	26.06	26.01	24.53	25.66	
715		1.65	0.46	0.22	0.08	1.19	0.53	7.59	1.14	1.42	0.61	26.67	24.45	24.41	25.29	
34		AGIII	0.13	0.31	0.18	0.50	1.04	0.03	14.07	0.80	1.46	1.44	28.32	27.37	26.04	27.28
249			0.21	0.13	0.14	0.37	0.65	0.01	7.07	0.58	1.80	0.23	26.46	26.51	24.77	26.64
514	0.25		0.50	0.29	0.81	0.30	0.00	4.58	0.38	0.95	0.46	30.32	27.44	25.51	27.66	
366	0.26		1.69	0.41	0.56	2.42	0.10	12.01	1.83	3.18	1.36	29.37	26.16	25.20	27.07	
428	0.29		0.46	0.58	1.73	1.72	0.03	7.34	0.23	1.31	0.41	26.55	24.74	23.56	25.02	
734	0.36		0.14	0.17	0.55	0.30	0.00	3.68	0.85	1.53	0.21	31.28	28.38	26.95	28.64	
28	0.43		0.14	0.47	0.29	0.73	0.05	16.83	1.37	2.33	1.20	31.42	30.50	28.03	29.95	
410	0.67		0.33	0.75	0.82	1.71	0.03	19.90	0.76	2.08	0.33	27.58	26.03	28.83	26.88	
338	0.85		1.81	1.15	1.31	1.99	0.13	14.82	3.72	3.54	1.75	28.93	27.21	24.60	26.87	
360	0.98		1.13	3.26	1.53	3.23	0.33	15.24	1.56	2.71	1.16	29.12	25.99	25.20	26.82	
1036	1.38		0.31	0.60	0.30	0.19	0.00	14.53	0.37	6.53	6.64	28.25	27.30	25.31	27.01	
347	1.38		0.38	0.12	0.32	1.00	0.05	2.40	1.19	1.89	0.83	27.12	23.86	23.22	24.64	
73	1.45		0.92	0.83	0.95	2.05	0.01	57.70	1.87	3.51	1.59	27.32	25.89	23.73	25.62	
905	1.51		1.75	1.60	0.70	1.93	0.16	10.04	2.14	3.36	2.02	30.17	28.10	26.02	28.07	
478	1.52		0.27	0.33	0.26	1.16	0.01	3.94	0.43	0.55	0.26	30.56	29.36	26.64	28.78	
233	1.54		0.38	0.53	0.68	1.36	0.07	8.14	0.66	2.20	1.50	26.75	25.35	24.66	25.71	
1033	1.55		0.52	0.64	0.54	0.83	0.05	23.25	1.50	3.32	1.42	27.33	27.00	26.02	26.90	
981	2.14		0.86	0.84	0.69	1.05	0.09	5.38	1.34	2.67	0.54	31.73	29.03	27.26	29.41	

Anexo 4. Dados de expressão gênica– Continuação

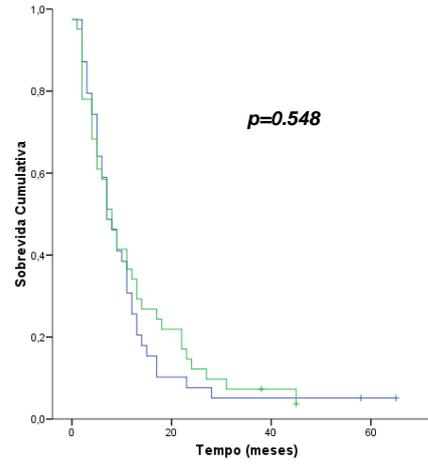
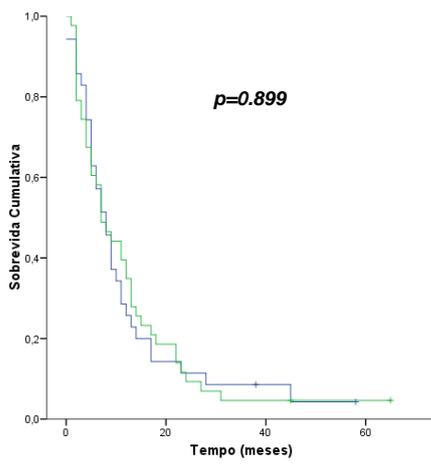
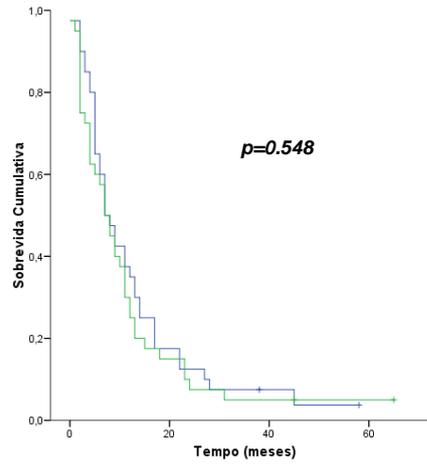
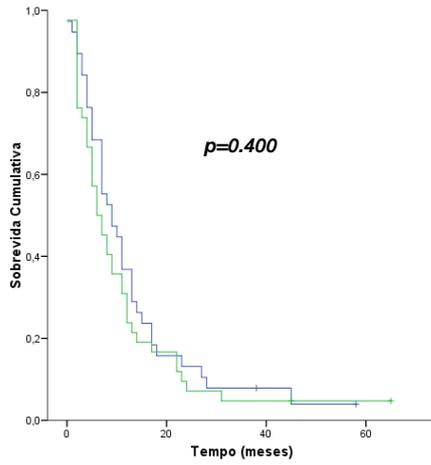
N	AP	Normalizadores											Médias Cts		
		ASCT2	LATI	GLS/SO1	GLS/SO2	GLS1	GLS2	GLUD1	GOT1	GOT2	GPT2	TBP		HPRT	GUS-b
632		0.02	0.03	0.00	0.01	0.06	0.00	0.08	0.03	0.04	0.01	28.12	24.61	22.58	25.01
1199		0.03	0.02	0.15	0.77	0.46	0.06	1.71	0.73	0.79	0.36	27.05	26.19	20.4	24.50
687		0.04	0.01	0.00	0.01	1.33	0.03	0.05	0.03	0.08	0.02	28.34	26.51	24.17	26.18
629		0.11	0.16	0.01	0.05	0.27	0.01	0.36	0.13	0.18	0.04	27.92	25.28	22.76	25.24
1144		0.18	0.66	2.94	0.08	2.33	0.35	3.98	5.29	4.12	0.58	27.49	24.93	22.87	25.16
698		0.19	0.07	0.12	0.16	0.01	0.00	4.34	0.49	1.07	0.17	29.15	25.97	23.86	26.32
1124		0.20	0.37	0.88	0.07	0.76	0.21	5.14	2.55	1.56	0.44	28.51	26.03	24.10	26.14
1212		0.22	0.24	0.41	0.37	0.70	0.03	5.44	1.24	2.36	0.59	27.05	26.35	23.00	25.47
1194		0.23	0.07	0.30	0.94	0.36	0.02	2.90	0.96	0.57	0.26	27.12	25.39	23.47	25.38
1205		0.23	0.04	0.26	0.85	0.36	0.00	2.49	0.52	1.16	0.27	26.03	24.62	22.11	24.27
1091		0.24	0.23	0.15	0.23	0.60	0.02	4.39	1.08	2.71	0.35	29.63	23.77	24.63	25.95
1007		0.30	0.22	0.14	0.21	0.09	0.01	0.98	0.86	2.51	0.21	28.27	25.53	23.81	25.81
384		0.31	0.20	0.20	0.41	0.51	0.01	2.57	0.37	1.62	0.19	28.51	25.61	22.77	25.64
1009		0.32	0.01	0.01	0.02	0.05	0.00	0.07	0.05	0.04	0.02	27.15	25.05	23.04	25.04
498		0.34	0.26	0.44	0.28	0.47	0.01	4.83	0.63	1.50	0.16	30.27	25.86	24.11	26.58
74		0.36	0.33	0.10	0.06	0.22	0.00	2.59	0.20	0.71	0.16	28.01	25.09	23.61	25.53
297		0.36	0.31	0.17	0.25	0.26	0.01	7.69	1.00	3.00	0.20	25.55	23.75	22.90	23.91
1003		0.38	0.05	0.17	0.51	2.87	0.02	4.35	0.27	1.45	0.11	25.82	25.4	24.2	25.14
204		0.38	0.10	0.14	0.30	0.35	0.00	2.23	0.64	1.37	0.20	27.08	24.88	22.12	24.66
1133		0.38	0.49	0.21	0.51	0.58	0.00	3.64	0.58	1.73	0.45	27.6	25.25	23.24	25.44
1162	AGIV	0.41	0.97	0.94	0.25	0.70	0.05	8.65	1.86	3.20	1.03	28.32	25.30	23.25	25.60
1123		0.47	0.29	0.29	0.28	0.48	0.01	4.43	0.63	1.94	0.45	28.89	24.5	23.5	25.59
1237		0.50	0.62	0.30	0.33	0.58	0.03	2.06	0.76	2.63	0.25	29.1	24.98	25.92	26.68
881		0.53	0.05	0.27	0.42	7.94	0.16	2.01	0.73	1.64	0.32	26.97	23	22.14	24.10
1243		0.55	0.46	0.23	0.35	0.44	0.03	3.53	0.84	2.57	0.47	28.56	25.00	23.66	25.64
792		0.56	0.07	0.09	0.27	1.09	0.01	1.11	0.39	1.25	0.10	27.14	24.55	22.32	24.52
510		0.57	0.28	1.06	0.58	1.51	0.07	2.04	0.71	0.93	0.14	28.57	25.52	22.33	25.16
879		0.57	0.19	0.39	0.20	0.06	0.00	1.86	0.50	1.21	0.08	27.59	24.67	23.00	25.00
269		0.58	0.04	0.10	0.36	1.38	0.01	2.56	0.38	0.97	0.62	28.11	26.30	24.93	26.44
1118		0.60	0.60	0.34	0.54	1.06	0.02	5.17	1.55	2.49	0.52	27.89	25.32	22.87	25.31
750		0.62	0.63	0.17	0.24	1.81	0.10	2.84	0.42	1.27	0.59	33.46	29.58	27.61	30.05
1103		0.67	0.38	0.18	0.12	0.31	0.00	2.93	0.83	1.90	0.26	31.00	30.00	27.09	29.33
524		0.68	0.14	0.09	0.19	0.89	0.04	4.46	0.27	1.32	0.04	30.02	26.39	24.02	26.90
1232		0.68	0.12	0.05	0.08	0.80	0.06	1.11	0.43	1.50	0.11	26.45	24.19	23.10	24.65
485		0.69	0.03	0.10	0.21	1.69	0.01	0.41	0.36	0.38	0.03	30.69	26.16	23.32	26.73
522		0.72	0.35	0.75	0.52	1.16	0.04	5.67	1.37	2.23	0.28	31.53	26.62	26.08	27.79
638		0.73	0.02	0.13	0.26	0.27	0.00	0.96	0.23	0.66	0.05	28.37	25.65	23.47	25.67
724		0.74	0.25	0.10	0.04	0.63	0.01	1.19	0.24	0.50	0.05	32.03	30.83	28.44	30.45
684		0.75	0.53	0.43	0.85	0.27	0.01	3.78	0.32	1.91	1.11	29.68	24.92	22.43	25.60
1190		0.75	0.43	0.14	0.35	0.41	0.01	2.25	0.73	1.64	0.37	27.78	25.56	23.82	25.68
875	0.77	0.14	0.11	0.24	1.40	0.02	3.76	0.98	1.77	0.14	28.86	23.51	22.43	24.77	
503	0.78	1.03	3.55	1.80	1.22	0.05	12.36	3.66	5.00	0.90	29.17	25.64	23.54	26.03	
1250	0.84	0.57	0.60	0.37	0.86	0.07	3.41	1.52	2.73	0.30	29.63	27.68	25.21	27.50	

Anexo 4. Dados de expressão gênica – Continuação

N	AP											Normalizadores			
		ASCT2	LAT1	GLISO1	GLISO2	GLS1	GLS2	GLUD1	GOT1	GOT2	GPT2	TBP	HPRT	GUS-b	Médias Cts
194		0.86	0.28	0.30	0.59	0.85	0.01	6.27	0.18	3.16	0.41	29.14	25.12	22.35	25.45
642		0.86	0.08	0.06	0.14	0.89	0.01	0.60	0.25	0.79	0.20	28.52	25.56	24.20	26.10
370		0.87	0.90	0.13	0.33	0.51	0.00	1.19	0.24	3.82	0.70	30.55	26.88	24.20	27.25
208		0.87	0.84	0.67	1.06	1.33	0.01	4.31	0.98	2.89	0.67	29.05	26.59	23.66	26.32
496		0.90	0.41	0.64	0.59	0.92	0.01	1.56	0.59	1.48	0.29	29.2	26.35	24.14	26.65
1077		0.93	0.37	0.17	0.17	0.31	0.01	3.23	2.66	1.52	0.16	29.37	26.17	23.86	26.54
555		0.94	0.26	0.44	0.82	0.67	0.02	4.45	0.91	2.66	0.18	25.53	22.86	21.5	23.33
427		0.94	2.05	0.42	0.96	0.75	0.00	6.29	1.45	6.14	1.34	29.39	26.99	25.43	27.25
1084		1.03	2.19	0.26	0.65	0.44	0.00	1.89	1.19	1.36	0.31	27.42	25.40	23.09	25.37
1161		1.06	1.15	0.40	0.17	0.67	0.04	5.40	1.40	2.31	0.23	27.54	25.27	22.11	24.97
884		1.13	0.44	0.27	0.58	0.17	0.01	6.41	0.64	2.16	0.35	26.63	24.14	23.05	24.65
397		1.14	0.02	0.04	0.08	0.44	0.00	0.99	0.28	0.54	0.02	27.09	26.27	24.84	26.07
405		1.14	0.25	0.07	0.24	0.16	0.01	2.16	0.70	1.84	0.10	26.96	26.71	24.01	26.01
317		1.15	0.44	3.51	0.21	3.76	0.80	6.42	2.39	2.08	0.83	28.87	27.13	25.10	27.07
450		1.16	2.51	0.52	1.18	0.92	0.01	7.72	1.78	7.54	1.65	28.61	26.95	26.20	27.17
854		1.23	0.86	0.68	0.25	2.68	0.05	10.43	2.62	6.63	0.19	29.53	26.05	23.05	26.17
1169		1.27	0.36	0.05	0.21	0.40	0.01	1.65	0.59	2.11	0.15	28.18	25.77	24.50	26.07
274		1.27	0.30	0.27	0.58	0.45	0.00	1.47	0.16	0.69	0.38	25.51	22.81	23.08	23.84
885		1.32	0.61	0.26	0.45	1.02	0.00	11.08	1.23	4.26	0.48	27.39	24.01	22.08	24.47
547		1.39	0.55	0.36	0.52	3.69	0.00	9.51	2.59	7.49	0.24	26.09	25.05	22.49	24.60
458		1.47	0.48	0.33	0.33	1.17	0.04	2.19	1.22	1.55	0.09	28.78	25.26	23.35	25.66
356	AGIV	1.57	0.37	0.23	0.34	1.39	0.05	3.77	1.01	1.87	0.24	27.51	25.46	21.51	24.75
1074		1.57	0.25	0.15	0.20	0.24	0.00	2.69	1.56	1.20	0.14	29.77	26.94	25.27	27.29
35		1.72	0.30	0.23	0.68	0.64	0.00	2.19	0.47	1.94	0.21	28.42	24.14	20.7	24.27
256		1.83	0.40	0.39	0.47	0.98	0.00	8.16	1.49	2.88	0.28	28.11	25.24	23.29	25.62
442		1.92	0.42	0.11	0.41	0.28	0.01	3.64	1.18	3.10	0.18	31.58	28.30	26.41	28.62
1070		1.94	0.71	0.13	0.63	0.32	0.00	2.08	1.54	2.40	0.38	27.62	24.44	22.91	24.87
891		1.98	0.58	0.29	0.56	0.56	0.00	6.24	0.39	2.71	0.68	27.59	25.69	23.36	25.47
175		2.01	0.04	0.15	0.21	1.28	0.03	2.42	0.27	0.70	0.09	27.4	24.66	24.65	25.47
1122		2.04	0.36	0.40	0.30	0.68	0.01	1.27	0.72	2.11	0.16	26.27	25.78	23.26	25.23
852		2.28	2.74	0.28	0.67	0.43	0.02	2.80	1.01	2.52	0.53	26.46	23.38	24.05	24.67
391		2.35	0.16	0.59	0.25	1.21	0.01	5.72	0.40	2.93	0.11	27.15	24.58	22.54	24.81
743		2.73	2.65	6.45	3.65	1.92	0.09	10.44	5.35	10.29	0.79	27.33	24.57	24.22	25.37
925		3.63	3.66	0.97	2.08	4.73	0.06	15.33	2.27	7.69	2.49	27.04	24.26	22.61	24.61
901		3.79	0.87	0.68	1.98	2.62	0.02	1.05	0.26	0.97	0.86	25.52	23.82	22.08	23.82
795		4.06	0.24	0.68	1.03	0.88	0.02	4.16	1.25	3.80	0.78	30.46	28.70	25.49	28.18
1002		5.88	2.28	0.98	2.02	2.70	0.01	12.73	2.14	7.09	0.57	30.07	30.06	27.50	29.24
592		7.78	7.59	4.77	2.68	9.28	0.07	27.18	7.23	22.70	4.99	30.8	29.84	27.33	29.33
903		11.51	0.47	0.57	1.18	4.08	0.00	4.59	0.90	3.45	0.54	26.68	24.89	23.27	25.06
640		11.58	2.57	1.81	2.58	1.18	0.00	8.39	3.74	4.67	0.66	26.12	23.38	21.66	23.72
663		12.79	11.37	2.58	3.62	17.00	0.04	68.23	17.72	30.22	4.80	26.22	23.78	22.95	24.37
930		14.41	5.79	1.29	3.34	5.65	0.06	44.75	8.36	17.01	3.23	26.35	24.93	23.24	24.95
573		15.43	6.24	1.48	7.10	55.42	0.38	14.39	11.10	20.85	7.74	27.36	23.87	22.74	24.75

Legenda: N: número do caso; AP: Anatomopatológico; NN: não neoplásico; AGI: Astrocitoma pilocítico; AGII: Astrocitoma de baixo grau; AGIII: Astrocitoma anaplásico; AGIV; Glioblastoma;

Anexo 5. Kaplan Meier



Anexo 4. Kaplan Meier – Continuação

