

## Marcadores Metabólicos Plasmáticos em Glioblastoma Multiforme

Galvani AF.<sup>1</sup>; Puttini R.<sup>1</sup>, Ferrasi AC.<sup>1</sup>, Kurokawa GA.<sup>1</sup>, Pardini MIMC.<sup>1</sup>, Zanini MA.<sup>1</sup>, Delafiori J.<sup>2</sup>, Oliveira NA.<sup>2</sup>, Dias- Audibert FL.<sup>2</sup>, Catharino RR.<sup>2</sup>, Hamamoto Filho PT.<sup>1</sup>, Lima EO.<sup>1</sup>

1- Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu(FMB), Botucatu, Brasil.

2- Universidade de Campinas (UNICAMP), Laboratório Innovare Biomarcadores, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campinas, Brasil.

### Introdução

O Glioblastoma Multiforme é o tumor primário do Sistema Nervoso Central com pior prognóstico e confere baixa taxa de sobrevivência ao paciente. A recente atualização da classificação molecular dos tumores de SNC inseriu novas alterações genéticas e epigenéticas como relevantes no diagnóstico molecular e adjuvantes à histopatologia na classificação tumoral. No entanto, a análise de metabólitos e suas caracterizações são uma abordagem promissora para o diagnóstico clínico e de valor prognóstico, entretanto são escassas em GBMs. Tais análises possibilitariam encontrar e indicar potenciais moléculas para utilização como novos alvos para uma intervenção terapêutica ou biomarcadores para o diagnóstico precoce. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar os metabólitos diferencialmente encontrados em GBM quando comparados à indivíduos saudáveis (CT) e inferir sobre a relevância destes marcadores em vias moleculares nesta patologia.

### Casuística e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (n.º. 3.491.414). Foram incluídos neste estudo, 50 doadores de sangue saudáveis (CT) e 24 pacientes acometidos por GBM. O plasma foi separado e submetido à extração de metabólitos, que foram ionizados e injetados diretamente em espectrômetro de massas (ESI-LTQ-XL- Thermo Scientific) para análise em modo de ionização positivo. As moléculas selecionadas foram analisadas por espectrometria de massas *in tandem* para verificação estrutural. Para a identificação molecular foi consultada literatura científica e bases de dados metabolômicos (METLIN, Human Metabolome Database, e LIPID maps). Os dados espectrais foram submetidos a análise *in silico* utilizando a plataforma MetaboAnalyst 5.0, com análise de PLS-DA. Os biomarcadores mais importantes para o grupo GBM foram obtidos através do VIP score (*Variable Importance in Projection*) (> 2,5) e verificados através de Fold Change (FC > 2,0) e T-test (p ≤ 0,05). Com a intenção de verificar o potencial diagnóstico dos marcadores, foram construídas curvas ROC para os metabólitos mais importantes e frequentes no grupo GBM.

### Resultados

O resultado da análise multivariada PLS-DA dos conjuntos de dados GBM e CT mostrou uma separação evidente entre os grupos, indicando o conjunto de marcadores de acordo com sua relação massa/carga (*m/z*) que poderiam diferenciar ambos os grupos quanto aos perfis metabólicos plasmáticos. Considerando a VIP score > 2,5, foram selecionados os 5 íons marcadores (*m/z*) mais abundantes e com maior poder discriminante do grupo GBM: 143, 931, 111, 294, 819, 936, 982.

Os dados espectrais foram submetidos a análise de *Fold Change* e Teste T com a intenção de observar as características *m/z* mais frequentes para o grupo GBM em comparação com o CT. Assim foram observadas: *m/z* = 931, 294, 112 (isótopo de *m/z* = 111), 936 e 982.

No gráfico de Volcano Plot, estão representados os íons marcadores (*m/z*) mais abundantes em GBM, à direita do gráfico (relação GBM/CT). Os valores *m/z* destacados correspondem aos biomarcadores selecionados conforme com os limiares de Log 2 FC (abundância) e p-valor (significância estatística) (Figura 1).

### Resultados

Em seguida, de acordo com as características de *m/z*, as moléculas foram identificadas em banco de dados metabolômicos disponíveis e avaliadas pelo seu envolvimento em vias tumorigênicas.

Estas moléculas foram: *m/z* 294 = Arginil-Prolina, *m/z* 931 = 3-O-Sulfogalactosilceramida (42:1), *m/z* 982 = NAPE, *m/z* 936 = 3-Oxodecanoil-CoA, *m/z* 111 = Piruvato, *m/z* 143 = 5-Hidroxi metiluracil e *m/z* 819 = Fosfatidilserina (38:9) (Tabela 1).

A figura 2 ilustra a *Heatmap* dos marcadores de maior importância encontrados no grupo GBM em relação ao grupo CT.

A acurácia das análises foi testada através da curva ROC e, os metabólitos Piruvato (*m/z* 111) e 5-Hidroxi metiluracil (*m/z* 143) apresentaram resultados interessantes. O Piruvato apresentou AUC = 0,974 (Figura 3a), com sensibilidade = 99,2% e especificidade = 94,6%. Quando o Piruvato foi colocado junto com a 5-hidroxi metiluracil, a curva ROC mostrou um melhor desempenho com AUC = 0,986 (Figura 3b), com sensibilidade = 98,3% e especificidade = 97,2%.

Figura 1. Volcano Plot dos biomarcadores de acordo com abundância e significado estatístico

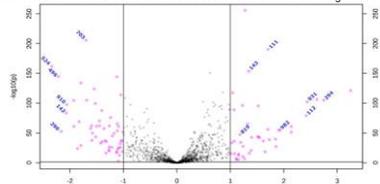


Tabela 1. Características dos metabólitos plasmáticos que diferenciam o grupo GBM do grupo CT.

<i>m/z</i>	Metabólito	Fórmula Molecular	Relatos de associações com câncer	Log <sub>2</sub> FC*	AUC ROC*	p-value
294	Arginil-Prolina	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Câncer colorretal	2,7526	0,844	3,8621E-105
931	3-O-Sulfogalactosilceramida (42:1)	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>15</sub> S	Vários tipos tumorais, associado às metástases	2,4353	0,800	6,2014E-103
111	Piruvato	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	Câncer gástrico e outros, associado com alterações no metabolismo central do carbono no câncer	2,4179	0,975	7,6819E-80
982	NAPE	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> NO <sub>6</sub> P	Leucemia Linfocítica Crônica	1,9059	0,690	1,2951E-55
936	3-Oxodecanoil-CoA	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> S	Associação Inédita com Câncer	1,8450	0,794	2,5604E-40
143	5-Hidroxi metiluracil	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Associado com eventos epigenéticos; Câncer de mama e colorretal	1,3418	0,911	2,3583E-154

\*Log<sub>2</sub> Fold Change = Razão de abundância entre as amostras do grupo GBM e o grupo CT; Metabólitos com AUC > 0,8 são considerados como bons ou excelentes biomarcadores; alta sensibilidade e alta especificidade. \*AUC = Área Sob a Curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve).

Figura 2. Heatmap dos biomarcadores de maior importância encontrados no grupo GBM em relação ao grupo CT.

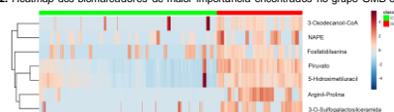
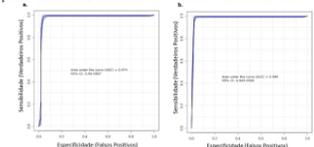


Figura 3. Apresentação da Curva ROC executada com Piruvato e combinada com 5-Hidroxi metiluracil.



Legenda: a. Análise do desempenho da curva ROC com Piruvato; b. Curva ROC da associação de Piruvato com 5-Hidroxi metiluracil.

### Conclusões

A análise metabolômica, por representar a interação entre os diferentes níveis "ômicos", fornece um estudo sistemático de um organismo. Esta análise fornece informações que contribuem para a compreensão da patologia, inferindo sobre atividades bioquímicas provenientes das atividades celulares. Neste estudo, alguns metabólitos encontrados são inéditos para GBM, especialmente em amostras de plasma. Assim, este estudo se faz importante para a compreensão da fisiopatologia do GBM ao estabelecer correlações de vias bioquímicas sem precedentes associadas a esta doença. Além disso, os nossos dados abrem novas oportunidades para investigar a fisiopatologia do tumor cerebral, bem como novos alvos de interferência farmacológica. Portanto, o presente estudo abre novos tópicos para uma investigação mais aprofundada, que poderá inferir sobre o comportamento dos GBMs e permitirá a avaliação e desenvolvimento de estudos posteriores quanto ao emprego destes biomarcadores na medicina translacional.

#### Agradecimentos:

- Laboratório Innovare de Biomarcadores – UNICAMP;
- Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP.

Financiamento: CAPES.

### Contato

Aline Faria Galvani. Email. [aline.galvani@unesp.br](mailto:aline.galvani@unesp.br) Tel. (14) 99604-2086.