

Weder Pereira de Menezes

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *MTAP* (METHYLTHIOADENOSINE PHOSPHORYLASE) E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL TERAPÊUTICO EM GLIOMAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rui Manuel Reis

Co-Orientador: Dr. Lucas Tadeu Bidinotto

Barretos, SP
2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

Weder Pereira de Menezes

Caracterização molecular de *MTAP* (Methylthioadenosine phosphorylase) e avaliação do seu potencial terapêutico em gliomas.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 28/05/2020

Banca Examinadora:

Dra. Silvia Regina Caminada de Toledo

Instituição: Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP

Dr. Carlos Gilberto Carlotti

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Dr. Dra. Céline Marques Pinheiro

Instituição: Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata.

Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Orientador

Dr. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto

Co-orientador

Dra. Leticia Ferro Leal

Presidente de banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número 2016/06833-2) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e CAPES

Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-graduação do Hospital de Câncer de Barretos-Fundação PIO XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos. Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo

A minha família, que me apoiaram durante toda esta caminhada e em especial à minha mãe, que sempre lutou pela minha educação, com certeza, minha maior herança.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis**, meu orientador, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelas orientações em momentos de dificuldade e pelo profissionalismo com que conduz seu trabalho. Agradeço por me auxiliar no desenvolvimento científico assim como por contribuir com meu crescimento profissional.

Ao **Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto**, meu co-orientador, por todo auxílio quando necessário e mesmo não estando sempre juntos se mostrou sempre à disposição a me auxiliar na busca das resoluções as minhas dúvidas.

À **Dra. Viviane Aline Silva**, pela gentileza, pela presença constante, pelo rigor científico, por entender meu rigor científico e sobretudo entender meu estado de espírito. Por contribuir nas discussões e soluções do trabalho e por tratar a ciência com extremo zelo e amor, requisitos importantes na construção de uma grande pesquisadora. Mas, acima de tudo, pelo carinho, amizade e respeito construídos ao longo destes anos, saiba que é sempre um aprendizado trabalhar com você, até quando discordamos. Formamos uma bela dupla!

Aos demais pesquisadores do **Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM)** pelas experiências transferidas e pelas contribuições ao longo do trabalho.

Aos membros das bancas de acompanhamento e qualificação, **Dra. Silvia Regina Caminada Toledo** e ao **Dr. Cristovam Scapulatempo Neto** pelas contribuições e sugestões para este trabalho, foram de extrema importância.

Ao **Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos**, em especial à **Dra. Gisele Caravina de Almeida**, pela revisão de lâminas e avaliação das imuno-histoquímicas assim como ao grupo responsável pela separação, confecção e cortes dos blocos de parafina.

Ao **NAP** (Núcleo de Apoio ao Pesquisador) pelo auxílio na confecção do Banco de Dados e análise estatística.

Ao **EPIT** (Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica) por toda eficiência nas compras de reagentes e, em especial ao Dorion e Joyce, por todo auxílio com pedido de bolsa e relatórios à FAPESP.

Ao **Departamento de Pós-Graduação**, por todo o auxílio e organização, nunca me deixando esquecer de algum relatório, compromisso ou prazo.

À **CAPES** e **FAPESP** pela concessão de bolsa de estudos e auxílios financeiros, essenciais na realização deste trabalho.

Ao **Hospital de Câncer de Barretos** pelo apoio financeiro e toda infraestrutura disponibilizada aos alunos e pesquisadores.

Aos biólogos, **André Lengert, Carolina Laus, Karina pepineli, Letícia Braga e Renato de Oliveira** pela amizade, apoio e suporte sempre que necessário.

Aos meus colegas de **CPOM**, que sempre me deram suporte nos diversos experimentos realizados e quais os melhores caminhos a seguir.

E finalmente à todos meus amigos conquistados no CPOM, em especial a **Aline Rocha, Angela, Ana Laura, Ariane, Cintia, Elisa, Karen, Fernanda Cury, Maraísa, Nathalia Campacci, Izabela,**

Marcela, Murilo, Paula e Raphaela Causin, pelo acolhimento, pelo trabalho árduo, pelos cafés, happy hours, amigos secretos, festas juninas, aniversários, festas fatídicas e mais trabalho árduo. A ordem alfabética não foi por acaso, precisaria de outra tese para descrever o que cada um de vocês representou ao longo destes anos. Saibam que todos vocês foram e são igualmente muito importantes para mim, cada um à sua maneira. Vocês ensinaram um aquariano a amar!

“Sucesso não é o final, fracasso não é fatal: é a coragem para continuar que conta”

Winston Churchill

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 27 |
| 1.1 | Sistema nervoso central | 27 |
| 1.2 | Câncer | 34 |
| 1.3 | Gliomas | 35 |
| 1.3.1 | Tratamento | 37 |
| 1.3.2 | Gliomas com crescimento delimitado | 38 |
| 1.3.3 | Gliomas difusos | 38 |
| 1.3.4 | Glioblastoma | 40 |
| 1.4 | O gene MTAP | 43 |
| 1.5 | Expressão de MTAP em tumores | 45 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 49 |
| 3 | OBJETIVOS | 50 |
| 3.1 | Objetivo principal | 50 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 50 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 4.1 | Fluxograma do projeto | 52 |
| 4.2 | Casuística | 52 |
| 4.3 | Análise <i>in silico</i> da expressão de MTAP e sua associação com sobrevida global | 55 |
| 4.4 | Avaliação imuno-histoquímica de MTAP | 56 |
| 4.5 | Linhagens celulares | 57 |
| 4.6 | Análise do perfil mutacional de linhagens celulares de glioma utilizando a estratégia Ampliseq | 58 |
| 4.7 | Análise mutacional de <i>TERT</i> | 60 |
| 4.8 | Avaliação da expressão de <i>MTAP</i> pela técnica de RT-qPCR | 61 |
| 4.9 | Avaliação da expressão de MTAP pela técnica de western blot | 62 |
| 4.10 | Silenciamento do gene MTAP pela técnica CRISPR/Cas9 | 62 |
| 4.11 | Transdução celular e geração de linhagem celular com expressão ectópica do gene MTAP pela técnica Lentiviral Infection System | 64 |
| 4.12 | Avaliação de perfil de expressão gênica das linhagens editadas pela plataforma NanoString | 65 |
| 4.13 | Ensaio funcionais de viabilidade, ciclo celular, proliferação, migração e invasão | 66 |
| 4.13.1 | Viabilidade celular | 66 |
| 4.13.2 | Determinação da IC50 | 67 |
| 4.13.3 | Análise da distribuição das fases do ciclo celular | 67 |
| 4.13.4 | Proliferação celular por monitoramento em tempo real com equipamento xCELLigence | 68 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| 4.13.5 | Ensaio de migração celular | 68 |
| 4.13.6 | Ensaio de invasão celular | 69 |
| 4.13.7 | Exposição das células transfectadas a agentes farmacológicos | 70 |
| 4.14 | Análise estatística | 70 |
| 4.15 | Aspectos éticos | 71 |
| 5 | RESULTADOS | 72 |
| 5.1 | Análise <i>in silico</i> das alterações moleculares de MTAP e seu impacto clínico | 72 |
| 5.2 | Avaliação da expressão de MTAP em pacientes com diagnóstico de glioma, por meio de imuno-histoquímica e correlação com dados moleculares e evolução clínica dos pacientes | 74 |
| 5.3 | Caracterização do status de expressão de MTAP em painel de linhagens comerciais e primárias de glioma | 78 |
| 5.4 | Silenciamento do gene MTAP pela técnica CRISPR System Transfection e Superexpressão do gene MTAP pela técnica Lentiviral Infection System | 79 |
| 5.5 | Avaliação de expressão gênica das linhagens editadas pela plataforma NanoString | 80 |
| 5.6 | Avaliação da proliferação celular por monitoramento em tempo real | 83 |
| 5.7 | Ensaio de migração e invasão celular | 85 |
| 5.8 | Estudo da viabilidade celular após edição gênica e exposição com fármacos inibidores de síntese de novo de purinas e com temozolamida | 87 |
| 5.9 | Análise do ciclo celular em linhagens celulares editadas geneticamente, expostas aos fármacos temozolamida e 6-tioguanina | 94 |
| 5.10 | Análise de proliferação e migração de linhagem de glioma editada geneticamente após exposição ao agente alquilante (TMZ) e inibidor de síntese de purinas (6TG) | 97 |
| 5.10.1 | Avaliação da proliferação celular | 97 |
| 5.10.2 | Migração celular | 103 |
| 6 | DISCUSSÃO | 112 |
| 7 | CONCLUSÕES | 117 |
| | REFERÊNCIAS | 118 |
| ANEXOS | | |
| Anexo A - | Ficha individual para coleta de dados clínico-patológicos | 134 |
| Anexo B - | Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa | 140 |
| Anexo C - | Alterações moleculares em linhagens celulares de glioma | 141 |
| Anexo D - | Alterações genômicas das linhagens celulares de glioma | 142 |
| Anexo E - | Estabelecimento das linhagens celulares MTAP ^{-/-} (U251) e MTAP ^{+/+} (SW1088) pelas tecnologias CRISPR/CAS9 e Lentivírus | 145 |
| Anexo F - | Genes diferencialmente expressos do clone U251MTAP ^{-/-} | 146 |
| Anexo G - | Genes diferencialmente expressos do clone SW1088MTAP ^{+/+} | 147 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Anexo H - | Monitoramento da proliferação celular dos clones editados geneticamente | 148 |
| Anexo I - | Genes potencialmente associados as vias de migração e invasão celular | 149 |
| Anexo J - | Artigo publicado em revista Cells | 150 |
| Anexo K - | Análise de sobrevida livre de doença | 174 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Corte sagital medial do encéfalo | 28 |
| Figura 2 | Vista lateral esquerda do encéfalo e corte coronal do cérebro | 29 |
| Figura 3 | Arcabouço celular cerebral | 30 |
| Figura 4 | Representação esquemática e fotomicrografias de preparados com método de impregnação metálica de complexo de Golgi representando parte da neuroglia do córtex cerebral | 31 |
| Figura 5 | Formação dos oligodendrócitos | 33 |
| Figura 6 | Diagrama representativo da classificação histológica e molecular integrada de gliomas difusos | 36 |
| Figura 7 | Modificação bioquímica a partir da mutação IDH associadas ao glioma | 42 |
| Figura 8 | Localização genômica do gene MTAP | 43 |
| Figura 9 | Via metabólica das poliaminas em que a enzima MTAP está envolvida | 44 |
| Figura 10 | Função enzimática de MTAP | 47 |
| Figura 11 | Delineamento experimental do projeto de pesquisa “Caracterização molecular de <i>MTAP</i> (Methylthioadenosine Phosphorylase) e avaliação do seu potencial terapêutico em gliomas” | 52 |
| Figura 12 | Anotação de MTAP no genoma humano | 64 |
| Figura 13 | Avaliação da expressão gênica de <i>MTAP</i> de pacientes com diagnóstico de glioblastoma, obtidos na base de dados TCGA-GBM | 72 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 14 | Análise <i>in silico</i> avaliada pelo método de kaplan-meier para uma condição (expressão de <i>MTAP</i>) associada com a sobrevida global em diferentes coortes de pacientes com diagnóstico de glioblastoma | 74 |
| Figura 15 | Padrões de marcação da proteína <i>MTAP</i> por imuno-histoquímica em tecido cerebral de pacientes com diagnóstico de glioma | 76 |
| Figura 16 | Análise de sobrevida pelo método de kaplan-meier de acordo com a expressão de <i>MTAP</i> para série de pacientes com diagnóstico de glioma | 77 |
| Figura 17 | Avaliação da expressão de <i>MTAP</i> em linhagens celulares de glioma | 79 |
| Figura 18 | Detecção dos genes diferencialmente expressos afetados pela edição do gene <i>MTAP</i> em linhagens de glioma | 82 |
| Figura 19 | Monitoramento dinâmico da proliferação celular utilizando a tecnologia de impedância | 84 |
| Figura 20 | Modulação dos processos de migração e invasão celular pelo gene <i>MTAP</i> | 86 |
| Figura 21 | Citotoxicidade do substrato 5'-metiltioadenosina (MTA) de acordo com a concentração | 88 |
| Figura 22 | Viabilidade celular para os clones U251WT, U251EV e U251MTAP ^{-/-} de acordo com a concentração dos fármacos 6-tioguanina e temozolamida combinado ou não com o substrato MTA | 91 |
| Figura 23 | Viabilidade celular para os clones SW1088WT, SW1088LB e SW1088MTAP ^{+/+} de acordo com a concentração dos fármacos 6-tioguanina e temozolamida combinado ou não com o substrato MTA | 93 |
| Figura 24 | Representação esquemática da análise do ciclo celular dos clones da linhagem celular U251 MTAP ^{-/-} e seu controle (U251EV), tratados com os fármacos 6-TG e temozolamida por 72 horas | 94 |
| Figura 25 | Representação esquemática da análise do ciclo celular dos clones da linhagem celular SW1088MTAP ^{+/+} e seu controle (SW1088LB), | |

| | | |
|------------------|--|-----|
| | tratados com os fármacos 6-TG (IC50) e temozolamida (IC50) por 72 horas | 96 |
| Figura 26 | Avaliação da proliferação celular medida em tempo real utilizando o equipamento xCELLigence para a linhagem celular U251 editada geneticamente | 98 |
| Figura 27 | Avaliação da proliferação celular medida em tempo real utilizando o equipamento xCELLigence para a linhagem celular SW1088 editada geneticamente | 99 |
| Figura 28 | Avaliação da proliferação celular dos clones editados geneticamente tratados farmacologicamente com 6TG | 101 |
| Figura 29 | Avaliação da migração celular para os clones U251 EV e U251MTAP-/- | 104 |
| Figura 30 | Avaliação da taxa migratória celular dos clones U251EV e U251MTAP-/- tratados com fármacos 6TG e TMZ | 106 |
| Figura 31 | Avaliação da migração da linhagem celular SW1088 controle (SW1088LB) e superexpressa (SW1088MTAP+/+) | 108 |
| Figura 32 | Avaliação da taxa migratória celular dos clones SW1088LB e SW1088MTAP+/+ tratados com fármacos 6TG e TMZ | 110 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabela1 - | Subtipos moleculares de glioblastoma e principais alterações | 42 |
| Tabela 2 - | Características clínico-patológicas dos pacientes com diagnóstico de glioma nos diferentes subtipos histológicos | 54 |
| Tabela 3 | Características clínico-patológicas dos pacientes com diagnóstico de glioma nos diferentes subtipos histológicos | 55 |
| Tabela 4 | Linhagens tumorais primárias e comerciais com diagnóstico de glioma | 58 |
| Tabela 5 - | Expressão diferencial de MTAP nos subtipos moleculares de glioblastoma | 73 |
| Tabela 6- | Avaliação da expressão de MTAP em Gliomas e associação com características clínico-patológicas dos pacientes | 75 |
| Tabela 7 | Concentração inibitória dos fármacos capaz de matar e ou inibir 50% das células tumorais de glioma U251 e SW1088 | 89 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| aCGH | Hibridização Genômica Comparativa em arrays |
| AA | Astrocitoma anaplásico |
| AD | Astrocitoma difuso |
| AMP | Adenosina Monofosfato |
| APC | Polipose adenomatosa coli |
| APRT | Adenosina fosforibosil transferase |
| bHLH | Hélice-alça-hélice básico |
| BMP | Proteína morfogenética óssea |
| BrdU | 5-Bromo-2'-Deoxyuridina |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| Cas9 | CRISPR associated protein 9 |
| CDKN2A | Ciclina dependente de cinase 2A |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| CIC | Repressor transcricional capicua |
| cm ² | Centímetro quadrado |
| CPO | Célula precursora de oligodendrócito |
| CRISPR | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |
| CTN | Célula tronco neural |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimetilsulfoxido |

| | |
|-------|--|
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline |
| DTT | 1,4 Ditioneitol |
| ECACC | German Collection of Microorganisms and Cell Cultures |
| EGFR | Receptor do fator de crescimento epidérmico |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| FUBP1 | Proteína 1 de ligação ao FUSE |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| GAG | Glioma de alto grau |
| GBG | Glioma de baixo grau |
| GBM | Glioblastoma |
| GFP | Proteína Fluorescente Verde |
| HEPES | Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) -piperazin-1-il] -etanossulfónico |
| HPV | Papilomavírus humano |
| IC50 | 50% de concentração inibitória |
| IDH1 | Isocitrato desidrogenase 1 |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| ISP | Partículas esféricas de ferro |
| MAPK | Proteína cinase ativada por mitógenos |
| MMP-1 | Metaloproteinase de matriz 1 |
| MMP-2 | Metaloproteinase de matriz 2 |
| MMP-9 | Metaloproteinase de matriz 9 |
| MOI | Multiplicidade de infecção |

| | |
|--------|---|
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| MTAP | Metiltioadenosina fosforilase |
| MTA | 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina |
| MTR-1P | Metiltioribose 1- fosfato |
| MTS | Tetrazólio [3 - (4,5-dimetil-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio, sal interno] |
| MTX | Metotrexato |
| NaF | Fluoreto de sódio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| OA | Oligoastrocitoma |
| OAA | Oligoastrocitoma anaplásico |
| OD | Oligodendroglioma |
| ODA | Oligoastrocitoma anaplásico |
| ODC | Ornitina descarboxilase |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OPC | Célula precursora de oligodendrócito |
| PA | Astrocitoma pilocítico |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3 cinase |
| PLP1 | Proteína proteolipídica 1 |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonil |
| PRMT5 | proteína arginina N-metiltransferase 5 |
| PRT | Fosforibosiltransferase |
| P/S | Penicilina/Streptoavidina |

| | |
|--------------|---|
| PXA | Xantoastrocitoma pleomórfico |
| RFP | Proteína Fluorescente Vermelha |
| RT-qPCR | Reação em cadeia de Polimerase quantitativa por transcrição reversa |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SEGA | Astrocitoma de células gigantes subependimais |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SCID | Imunodeficiência combinada severa |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante |
| SHH | Sonic hedgehog |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| STR | Sequências de Repetição em Tandem |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| TET | Protein ten-eleven translocation |
| TERT | Telomerase reverse transcriptase |
| TGF- β | Fator de transformação do crescimento beta1 |
| TMA | Microtissue array |
| TMZ | Temozolamida |
| TUNEL | Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling |
| TSVC | Torrent Suite Variant Caller |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| 2HG | 2-Hidroxioglutarato |
| 6MP | 6-Mercaptopurina |
| 6TG | 6-Tioguanina |

| | |
|-------------------------|---------------------------|
| μL | Microlitro |
| $\mu\text{g}/\text{mL}$ | Micrograma por microlitro |
| μM | Micromolar |
| mM | Milimolar |
| mL | Mililitro |
| ng | Nanograma |
| nM | Nanomolar |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|----------------|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| λ | Lambda |
| Δ | Delta |
| μ | micro |
| $^{\circ}\text{C}$ | Centígrado |
| M | Molar |
| % | Porcentagem |
| > | Maior |
| < | Menor |
| \leq | Menor ou igual |
| \geq | Maior ou igual |
| \pm | Mais ou menos |

RESUMO

JUSTIFICATIVA: Os gliomas são os tumores primários mais frequentes do sistema nervoso central (SNC), sendo classificados pela OMS de I a IV de acordo com o grau de malignidade. Os gliomas apresentam diversas alterações moleculares entre seus subtipos, como a mutação de *TP53* e *IDH1/2* além da deleção de regiões cromossômicas, a observar região 9p21 onde se localiza o gene *MTAP*. Este gene codifica a enzima presente na via das poliaminas e responsável pela clivagem de 5'-metiltioadenosina (MTA) e reciclagem de metionina e adenina celular. Devido à sua proximidade com o gene supressor tumoral *CDKN2A*, o gene *MTAP* é frequentemente deletado em diferentes tipos tumorais, incluindo os gliomas. A perda de expressão de *MTAP* nos gliomas é observada nos diversos subtipos histológicos, mas sobretudo, em gliomas de alto grau como os glioblastomas. O glioblastoma (OMS grau IV) é um tumor altamente agressivo, com taxa de mortalidade e tratamento ainda pouco eficazes, principalmente pela diversidade de alterações moleculares, o que acaba por levar o tumor a desenvolver resistência aos fármacos utilizados na rotina clínica. A terapia padrão para glioblastoma é cirurgia, seguida de radioterapia e quimioterapia, utilizando o fármaco temozolamida (TMZ). Contudo, a alta mortalidade e a ausência de resposta à TMZ, se mostra um grande desafio para o tratamento de gliomas. Estratégias terapêuticas tendo como alvo a presença de mutação ou deleção de genes, como observado com o gene *MTAP*, têm sido propostos, dentre eles, aqueles com o uso de inibidores da síntese de novo de purinas e pirimidinas. No entanto, são pouco conhecidas as alterações moleculares resultantes da modulação de *MTAP*, além de conhecer seu papel biológico no desenvolvimento dos glioblastomas. Este trabalho busca caracterizar este gene, além de avaliar os efeitos de sua modulação propondo ainda a avaliação do seu uso como um possível alvo terapêutico para gliomas. **OBJETIVO:** Caracterizar as alterações moleculares de *MTAP* em gliomas, e determinar os efeitos da modulação gênica e o uso como potencial alvo terapêutico utilizando agentes inibidores de síntese de novo de purinas e pirimidinas com o substrato MTA. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Avaliação da expressão de *MTAP* por imuno-histoquímica de 641 amostras de glioma e associação do perfil de expressão com as características clinico-patológicas dos pacientes. Estes dados foram comparados com a análise *in silico* a partir do banco de dados TCGA e Oncomine totalizando 444 pacientes. A expressão de mRNA e proteica de *MTAP* foi também avaliada em 18 linhagens celulares de gliomas. Por fim, através do silenciamento de *MTAP* da linhagem U251 (U251*MTAP*^{-/-}) pelo método de CRISPR/Cas9 e da superexpressão de *MTAP* na linhagem SW1088 (SW1088*MTAP*^{+/+}) pelo sistema lentiviral, o perfil molecular, biológico e terapêutico desta modulação foi avaliado. **RESULTADOS:** A análise *in silico* de 350 casos de glioblastoma, indicou uma associação direta entre a perda da região 9p21, onde está localizado o gene *MTAP* e a sua menor expressão ($p < 0,01$). Além disso, a correlação entre a expressão de *MTAP* e a melhor sobrevida em pacientes com diagnóstico de glioblastoma, foi observada apenas para o conjunto de dados (Freije – Oncomine; $p = 0,00863$). A avaliação da expressão de *MTAP* por imuno-histoquímica, demonstrou uma perda de expressão global de 44,1% dos casos, com a maior perda de expressão observada nos subtipos de maior grau de malignidade, como os glioblastomas adulto (45,6%) e pediátricos (54,8%). Já a análise de sobrevida global, indicou um melhor prognóstico para o grupo de gliomas de baixo ($p = 0,03$), inversamente ao observado nos gliomas de alto grau ($p = 0,0005$) e glioblastoma adulto ($p = 0,001$). A avaliação do perfil de expressão gênica dos clones editados geneticamente, identificou 17 genes diferencialmente expressos para o clone U251 *MTAP*^{-/-} ($p < 0,05$) e 6 para

o clone SW1088 *MTAP*^{+/+} ($p < 0,05$). Estes genes estão associados a agressividade e proliferação celular na linhagem U251 *MTAP*^{-/-}, ao controle de expressão e transdução de sinais na linhagem SW1088 *MTAP*^{+/+}. O efeito da edição gênica não alterou a capacidade de proliferação, migração e invasão dos clones U251*MTAP*^{-/-}, assim como dos clones SW1088*MTAP*^{+/+} comparados aos controles ($p > 0,05$). O efeito dos fármacos temozolamida (TMZ) e 6-tioguanina (6TG) indicou uma maior sensibilidade do clone U251*MTAP*^{-/-} ao clone U251EV ($p < 0,05$). Já a linhagem SW1088*MTAP*^{+/+} se mostrou ligeiramente mais resistente ao fármaco 6TG quando comparado ao clone parental SW1088 LB. Além disso, a presença de MTA reduziu a citotoxicidade de 6-tioguanina tanto para o clone U251*MTAP*^{-/-} quanto para o clone SW1088*MTAP*^{+/+} ($p < 0,05$). **CONCLUSÃO:** A perda de *MTAP* acompanha a evolução do grau de malignidade dos gliomas, e ocorre em cerca de metade dos gliomas de alto grau. No entanto, a ausência de *MTAP* não é um evento determinante no processo biológico tumoral, e não impacta na sobrevida dos pacientes. Apesar disso, a abordagem de tratamento com tiopurinas em tumores que apresentem como característica a deleção de *MTAP* e suplementados com MTA sugere uma hipótese a ser considerada para aumentar a eficácia em pacientes com glioblastoma.

PALAVRAS-CHAVE: Gliomas, Glioblastoma, Gene supressor tumoral, *MTAP* (*Metiltioadenosina fosforilase*), Inibidores de síntese de novo, deleção.

ABSTRACT

BACKGROUND: Gliomas are the most frequent primary tumors of the central nervous system (CNS), being classified by the WHO from I to IV, according to the degree of malignancy. Gliomas show several molecular changes among their subtypes, such as the *TP53* and *IDH1/2* mutation, in addition to the deletion of chromosomal regions observing the 9p21 region, where the *MTAP* gene is located. This gene encodes the enzyme present in the polyamine pathway and is responsible for the cleavage of MTA and the recycling of methionine and cell adenine. Due to its proximity to the tumor suppressor gene *CDKN2A*, the *MTAP* gene is often deleted in different tumor types, including gliomas. The loss of MTAP expression in gliomas is observed in different histological subtypes, but mainly in high-grade gliomas such as glioblastomas. Glioblastoma (WHO grade IV) is a highly aggressive tumor, with mortality and treatment rates still ineffective, mainly due to the diversity of molecular changes, which ultimately leads the tumor to develop resistance to the drugs used in the clinical routine. The standard therapy for glioblastoma (WHO grade IV) is surgery, followed by radiotherapy and chemotherapy, using the drug temozolomide (TMZ). However, the high mortality and a lack of response to TMZ, proves to be a great challenge for the treatment of gliomas. Therapeutic strategies aimed at the presence of mutation or exclusion of genes, as observed with the *MTAP* gene, have been proposed, among them, those with the use of inhibitors of purines and pyrimidines. However, the molecular changes resulting from modulation of *MTAP* are little known, in addition to knowing its biological role in the development of glioblastomas. This work seeks to characterize this gene, in addition to evaluating the effects of its modulation, proposing the evaluation of its use as a possible therapeutic biomarker for gliomas. **AIM:** To characterize the molecular alterations of *MTAP* in gliomas, and to determine the effects of gene modulation and use as a potential therapeutic target using inhibitors of *de novo* synthesis of purines and pyrimidines with the MTA substrate. **MATERIALS AND METHODS:** Evaluation of *MTAP* expression by immunohistochemistry of 641 glioma samples and association of the expression profile with the patients' clinical and pathological characteristics. These data were compared with the *in silico* analysis from the TCGA and Oncomine database, totaling 444 patients. The expression of *MTAP* mRNA and protein was also evaluated in 18 cell lines of gliomas. Finally, by silencing the U251 line (U251MTAP^{-/-}) and overexpressing the SW1088 line (SW1088MTAP^{+/+}) the molecular, biological and therapeutic profile of this modulation was evaluated. **RESULTS:** *In silico* analysis of 350 cases of glioblastoma, indicated a direct association between the loss of the 9p21 region, where the *MTAP* gene is located and its lower expression ($p < 0.01$). Also, the correlation between *MTAP* expression and better survival in patients diagnosed with glioblastoma, was observed only for the data set (Freije-Oncomine; $p = 0.00863$). The evaluation of *MTAP* expression by immunohistochemistry showed a loss of global expression of 44.1% of the cases, with the highest loss of expression observed in the subtypes with the highest degree of malignancy, such as adult (45.6%) and pediatric (54.8%) glioblastomas. The overall survival analysis, on the other hand, indicated a better prognosis for the group of low gliomas ($p = 0.03$), inversely to that observed in high-grade gliomas ($p = 0.0005$) and adult glioblastoma ($p = 0.001$). The evaluation of the gene expression profile identified 17 differentially expressed genes for the U251 MTAP^{-/-} clone ($p < 0.05$) and 6 for the SW1088 MTAP^{+/+} clone ($p < 0.05$). These genes are associated with aggressiveness and cell proliferation in the U251 MTAP^{-/-} line, with the control expression and signal transduction in the SW1088 MTAP^{+/+} line. The effect of gene editing did not change the proliferation,

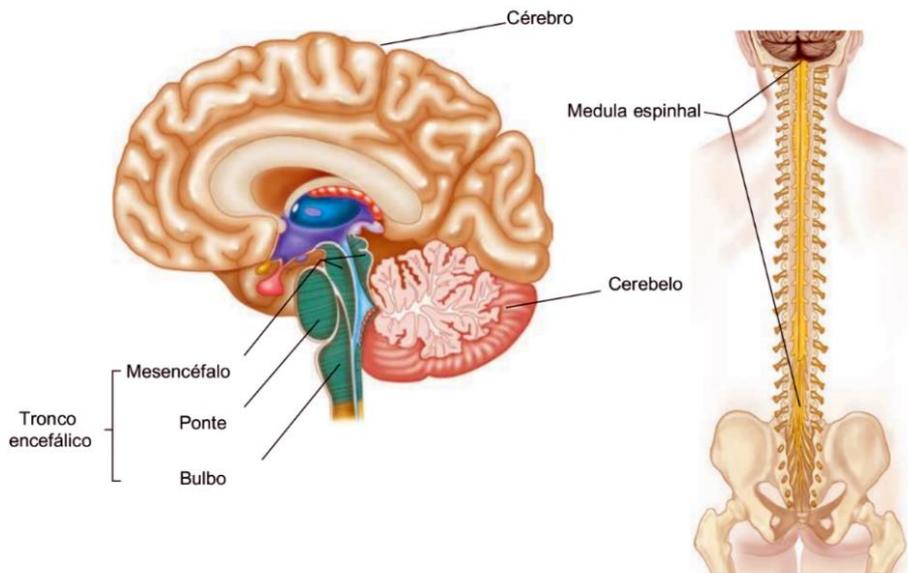
migration and invasion capacity of U251MTAP^{-/-} clones, as well as that of SW1088MTAP^{+/+} clones compared to controls ($p > 0.05$). The effect of the drugs TMZ and 6TG indicated a sensitivity of the U251MTAP^{-/-} clone to the U251EV clone ($p < 0.05$). The strain SW1088MTAP^{+/+} was slightly more resistant to the drug 6TG when purchased from the parental clone SW1088LB. In addition, the presence of MTA reduced the cytotoxicity of 6TG for both U251MTAP^{-/-} clone and SW1088MTAP^{+/+} clone ($p < 0.05$). **CONCLUSION:** The loss of MTAP accompanies the evolution of the degree of malignancy of gliomas, and occurs in about half of high-grade gliomas. However, the absence of MTAP is not a determining event in the biological tumor process and does not impact patient survival. Despite this, the approach to treatment with thiopurines in tumors that feature the deletion of *MTAP* gene and supplemented with MTA suggests a hypothesis to be considered to increase efficacy in patients with glioblastoma.

KEYWORDS: Gliomas; Glioblastoma; *MTAP* (*Methylthioadenosine phosphorylase*), *de novo* biosynthesis inhibitors

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema nervoso central

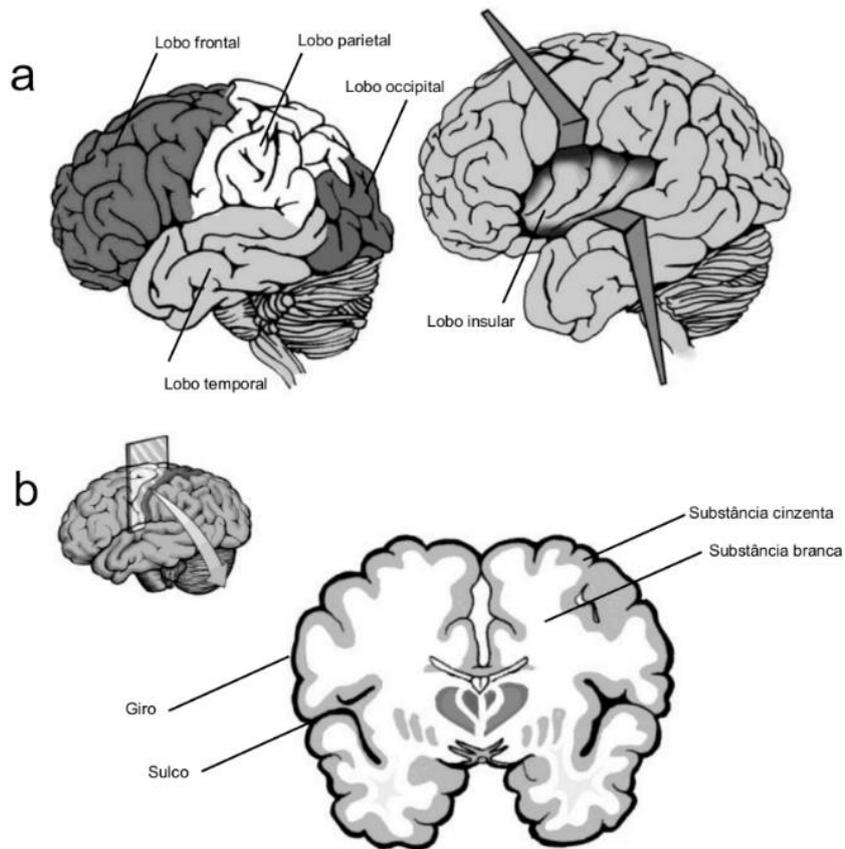
O sistema nervoso central (SNC) é um termo que reúne todas as estruturas neurais situadas dentro do crânio e da coluna vertebral. Anatomicamente o SNC pode ser dividido de acordo com o grau de complexidade de seus componentes. O encéfalo constitui-se da porção do SNC contida no interior da caixa craniana enquanto que a medula espinhal se prolonga a partir do encéfalo percorrendo o interior da coluna vertebral (Figura 1). A medula espinhal tem uma forma cilíndrica no centro da qual percorre o líquido cefalorraquidiano; apresenta funções motoras e sensitivas relacionadas ao controle do corpo. O encéfalo possui forma irregular, com saliências evidenciando diversas subdivisões.^{1, 2} As funções do encéfalo são bastante complexas, possibilitando todo o funcionamento mecânico, fisiológico, cognitivo e sensitivo dos seres humanos, assim como das funções presentes nos animais não humanos.³ A partir do encéfalo, podemos visualizar três porções: o cérebro, constituído por dois hemisférios justapostos e separados por um sulco profundo; o cerebelo, também constituído de dois hemisférios, mas sem sulco de separação e o tronco encefálico, estrutura em formato de haste que se continua com a medula espinhal inferiormente e se inserindo superiormente ao cérebro.^{1, 4, 5}



Fonte: modificado de Elaine N. Marieb⁶

Figura 1 - Corte sagital medial do encéfalo.

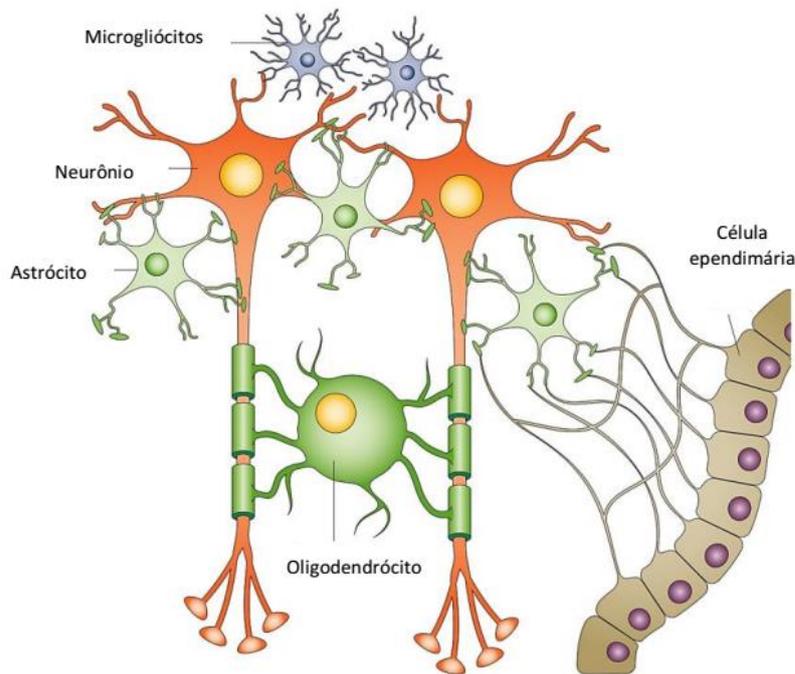
O cérebro é um órgão altamente complexo que possui em sua superfície o córtex cerebral, uma estrutura composta de giros e sulcos, onde se localizam as regiões com as funções neurais mais complexas. Anatomicamente, o cérebro pode ser dividido em grandes regiões denominados lobos: frontal, parietal, occipital, temporal e insular (Figura 2a).⁷ Além disso, todo o cérebro é recoberto por uma extensa rede de capilares sanguíneos que fornecem oxigênio e nutrientes para manutenção do meio bioquímico ótimo para o funcionamento neural.^{1, 2} O cérebro se divide em dois hemisférios, direito e esquerdo, interligados entre si pelo corpo caloso. Ao se observar os hemisférios internamente, observa-se uma região externa mais cinzenta – o córtex cerebral que contém os corpos celulares dos neurônios. Logo abaixo se encontra uma camada de substância branca, contendo feixes de axônios neuronais mielinizados (Figura 2b).^{5, 8} Assim como no cérebro, o córtex cerebelar apresenta a substância cinzenta externamente e a substância branca internamente. Ao contrário, em outras regiões do corpo, a substância cinzenta é interna em relação à substância branca.^{1, 8}



Fonte: modificado de Sami Souza

Figura 2 - Vista lateral esquerda do encéfalo e corte coronal do cérebro. A) Distribuição anatômica dos lobos cerebrais. B) Localização anatômica da substância cinzenta e substância branca no cérebro.

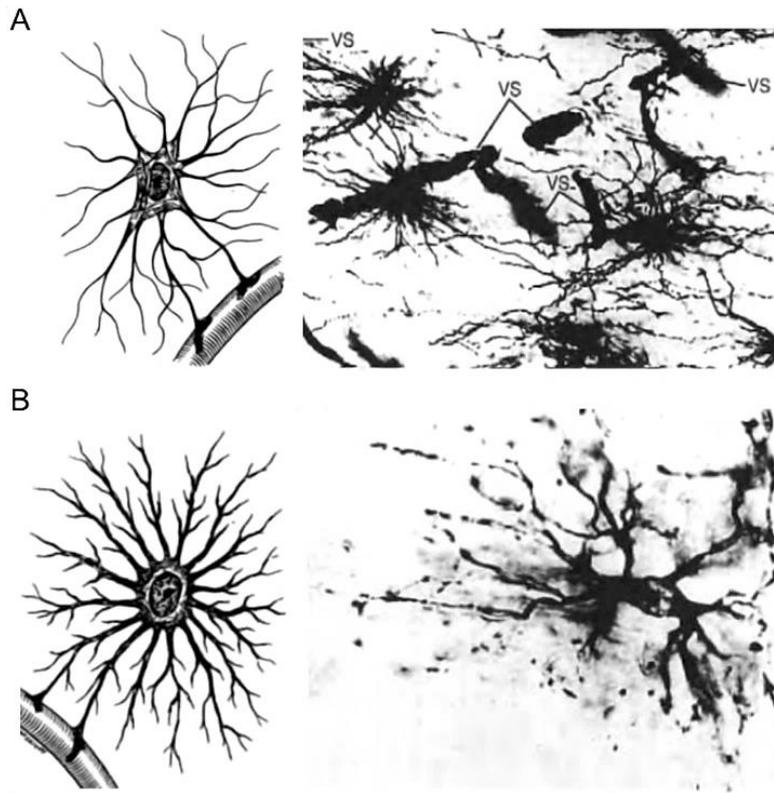
O tecido nervoso compreende basicamente dois grupos celulares: os neurônios e as células de suporte (neuroglia) (Figura 3), desenvolvidas a partir de células tronco neurais (CTNs), que estão interconectadas em uma complexa rede de comunicação e possuem capacidade proliferativa ao longo da vida em algumas regiões do cérebro.⁸⁻¹⁰



Fonte: modificado de Weller et al. ¹¹

Figura 3 - Representação esquemática do arcabouço celular cerebral

Os astrócitos são as maiores células da neuroglia, possuindo um formato estrelado e caracterizados por inúmeros prolongamentos. Em geral os astrócitos são conhecidos por auxiliar na arquitetura do cérebro, regular o balanço hídrico e manter a barreira hematoencefálica.¹² Os astrócitos maduros se subdividem em duas categorias: astrócitos fibrosos e astrócitos protoplasmáticos. Os astrócitos fibrosos, são encontrados principalmente na substância branca, possuem processos que irradiam do corpo celular e terminam em expansões denominadas “pés vasculares” que se comunicam com os vasos sanguíneos dentro do SNC (Figura 4A). Eles apresentam núcleo com marcação fraca por imuno-histoquímica, devido à baixa quantidade de heterocromatina e ausência de nucléolo e filamentos gliais que podem ser evidenciados com marcação pelo marcador da proteína ácida fibrilar glial (GFAP)¹³. Já os astrócitos protoplasmáticos estão localizados ao longo da substância cinzenta apresentando dendritos mais espessos, curtos e mais numerosos. Possuem poucos filamentos gliais e ligação mais direta com os neurônios, sendo também conhecidos como células satélites (Figura 4B).



Fonte: modificado de Junqueira & Carneiro⁸

Figura 4 - Representação esquemática (à esquerda) e fotomicrografias de preparados com método de impregnação metálica de complexo de Golgi representando parte da neuroglia do córtex cerebral (à direita). A) Astrócitos fibrosos com prolongamentos envolvendo vasos sanguíneos (VS); aumento 1000x. B) Astrócitos protoplasmáticos próximos a superfície cerebral; aumento 1900x.

Ambos os astrócitos, fibrosos e protoplasmáticos, se conectam com corpos neuronais, dendritos e axônios e atuam de forma especial envolvendo as sinapses contribuindo para as funções de isolamento e sustentação.⁸ Eles também participam da sinalização célula a célula, regulando o fluxo de cálcio, liberando D-serina, produzindo neuropeptídios e modulando a transmissão sináptica. Dependendo da necessidade, os astrócitos também atuam na captação de potássio extraneuronal diminuindo sua concentração extracelular e na recaptação de neurotransmissores como o glutamato, que em excesso, se torna tóxico aos neurônios. Além disso, nos casos de lesão do tecido neuronal, os astrócitos iniciam processo de mitose

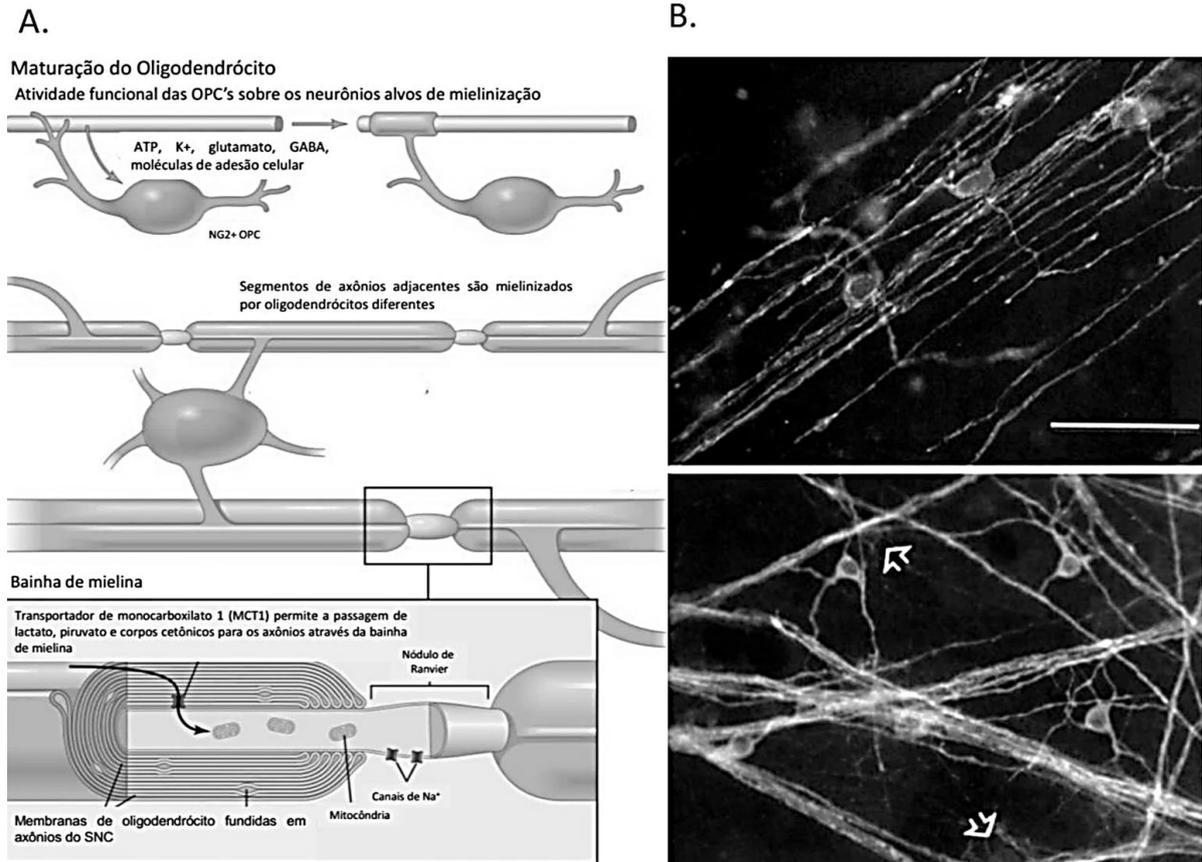
ocupando o espaço lesionado ou de regiões de sinapse em caso de degeneração neuronal. Por fim, os astrócitos também atuam dando suporte nutricional, secretando fatores neurotróficos importantes no desenvolvimento e manutenção dos neurônios.¹⁴⁻¹⁶

Os oligodendrócitos são células menores que os astrócitos, possuindo núcleos menores e nucleoplasma condensado, além de poucos prolongamentos. O citoplasma é preenchido com mitocôndrias, microtúbulos e ribossomos, porém com ausência de neurofilamentos.

Assim como os astrócitos, os oligodendrócitos se originam de células tronco neurais (CTNs), que se diferenciam posteriormente em células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) através da influência do gene *sonic hedgehog* (SHH), e dos fatores de transcrição *Nkx6* e *Olig2*.¹⁷ As OPCs representam o estágio intermediário na oligodendrogênese e persistem no cérebro adulto como células *Olig2+*/*NG2+* onde então se proliferam, dando origem aos oligodendrócitos maduros.^{10,17} Os oligodendrócitos maduros expressam diversos marcadores de mielina incluindo a proteína de mielina, proteína proteolípídica 1 (PLP1) e a proteína polipose adenomatosa coli (APC), além de expressar *Olig2* considerado um marcador da linhagem de oligodendrócitos.

Cada oligodendrócito consegue mielinizar até 60 axônios, com padrão de mielinização que leva à formação de regiões nuas denominadas nódulos de Ranvier. Os nódulos de Ranvier são ricamente povoadas por canais de Na⁺ e são recobertos pelos pés terminais dos astrócitos.¹ Este processo é conduzido pelas proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), sendo os sinais bioquímicos (ATP, K⁺, glutamato e GABA) além do tamanho do axônio indutores do processo de mielinização(Figura 5).¹⁸

Existem ainda os oligodendrócitos não mielinizantes (oligodendrócitos satélites) encontrados na porção cinzenta do córtex cerebral próximos aos neurônios e vasos sanguíneos⁵



Fonte: modificado de Netter's & Butt ¹⁹

Figura 5 - Formação dos oligodendrócitos. A) Representação esquemática do desenvolvimento de oligodendrócitos maduros. B) Marcação imunológica de oligodendrócitos demonstrando mielinização de axônios com pequenos (acima) e grandes diâmetros (abaixo). As setas indicam a presença de oligodendrócitos não maduros.

A macróglia se mostra crucial na manutenção das funções neurológicas principalmente pelo papel de suporte oferecido aos neurônios. Além disso, essas células estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento de diversas doenças como a esclerose lateral amiotrófica, epilepsia e doença de Parkinson's e câncer.^{13, 20} O estudo de marcadores específicos como GFAP (Doença de Alexander) e a mutação de *PLP1* que causa falha no desenvolvimento das células precursoras de oligodendrócitos são importantes para o estudo do processo de desenvolvimento e progressão de doenças neurológicas e podem facilitar a busca de alvos terapêuticos.

1.2 Câncer

O câncer é um termo genérico para um conjunto de mais de 100 doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Sua principal característica é o crescimento desregulado de células que crescem além dos seus limites, invadindo tecidos e órgãos adjacentes, podendo invadir outras regiões do corpo, processo conhecido como metástase.²¹ O câncer envolve um processo contínuo de expansão clonal, diversificação genética e seleção clonal dentro do microambiente tecidual. Em 1976, Peter Nowell²² publicou um estudo caracterizando o câncer como um processo evolutivo, conduzido por células somáticas com mutações e seleção sequenciais, paralelo ao visto na seleção natural darwiniana. Estas células, ao longo do tempo, necessitam ser constantemente reguladas para auto renovação e estabilidade telomérica, caso contrário, se tornam não responsivas à sinais específicos que regulam a diferenciação, proliferação e morte celular, multiplicando rapidamente e se tornando incontroláveis, determinando a formação dos tumores que podem se espalhar pelo corpo.²³ O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e em geral ocorre a partir de alterações genéticas que alteram a estrutura do DNA da célula levando a sucessivas alterações que resultarão em um tumor posteriormente. Os danos genéticos em duas classes de genes (os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais) estão envolvidos diretamente na perda desta regulação, levando às falhas nos mecanismos de reparo e controle celular.²⁴ Os proto-oncogenes são ativados por alterações tornando-se oncogenes aumentando a proliferação celular, já a perda dos genes supressores tumorais leva à perda desta regulação possibilitando o crescimento descontrolado.

Além disso, mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e os microRNA's que regulam o padrão de expressão gênica normal dos tecidos, estão associados à alterações que podem resultar na transformação maligna celular.²⁵ De acordo com estudo de Hanahan e Weinberg²⁶, durante o desenvolvimento tumoral, as células adquirem diversas capacidades que dão sustentação ao processo de tumorigênese. Dentre elas estão presentes: a manutenção da sinalização proliferativa, descontrole dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade celular, indução à angiogênese e ativação da invasão e metástase.^{26, 27} O processo do desenvolvimento tumoral pode ser iniciado espontaneamente por falhas nos processos de reparação do DNA assim como pela ação

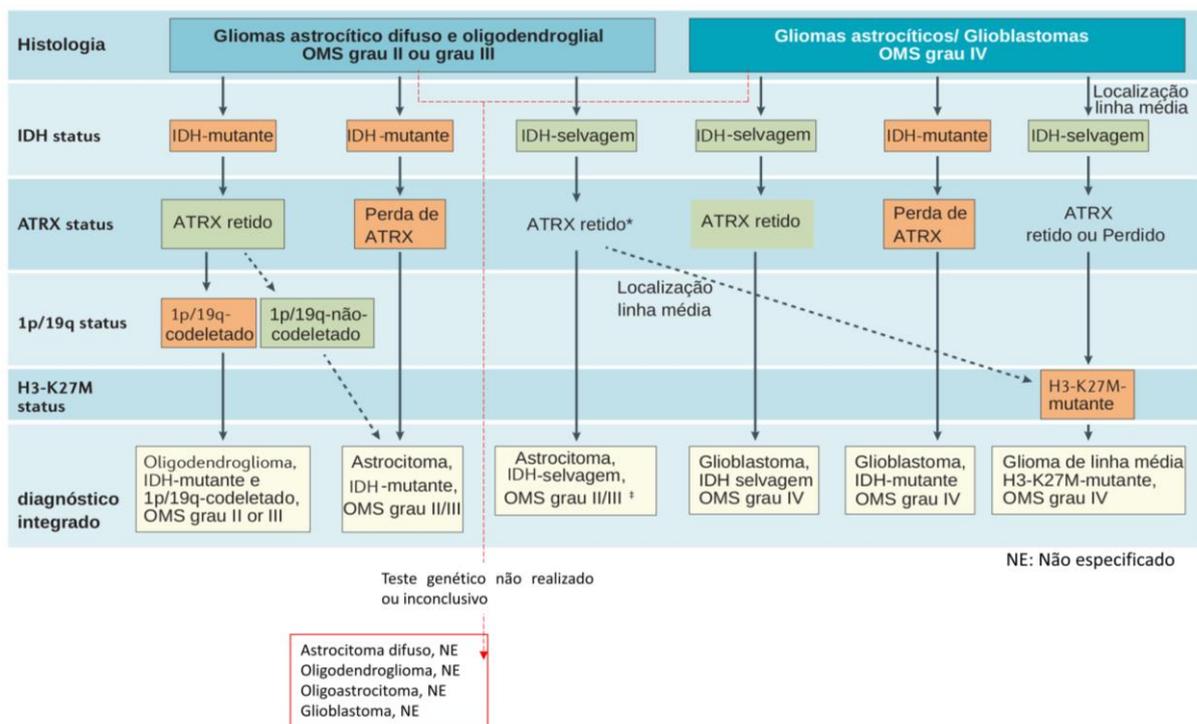
externa através de carcinógenos.²⁴ Dentro deste grupo, estão inseridos fatores ambientais e de estilo de vida potencialmente indutores do desenvolvimento tumoral, como tabagismo, álcool, dieta, sedentarismo, fatores ocupacionais, fatores ambientais (ex. poluição), além de agentes infecciosos como o papilomavírus humano (HPV).²⁸

1.3 Gliomas

Os gliomas são tumores primários, originados a partir da disfunção de células da glia: astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais responsáveis pelo suporte estrutural e metabólico aos neurônios.^{10, 29, 30} Eles representam 26% dos tumores primários e 81% dos tumores malignos do SNC, sendo responsáveis pela alta mortalidade presente nestes tumores^{11, 31}. Apesar da baixa incidência (~3%) destes tumores, os gliomas representam a segunda maior incidência para a faixa de 0 a 14 anos, sendo portanto, um importante tema de saúde pública.^{21, 31, 32} No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou, para o triênio 2020-2022, o surgimento de aproximadamente 11.090 novos casos de tumores do SNC. Estes valores correspondem a um risco de 5,61 casos novos a cada 100 mil homens e de 4,85 casos novos para 100 mil mulheres^{21, 32}. Os gliomas são, em geral, tumores heterogêneos e que apresentam incidência e mortalidade bastante variável, de acordo com a classificação, subtipo histológico e características como crescimento e invasão local.^{11, 21}

Até 2016, os gliomas eram classificados em categorias, levando-se em consideração a sua histologia e as similaridades morfológicas, sendo denominados de forma ampla: astrocitomas (75,8%), oligodendrogliomas (5,3%), oligoastrocitomas (2,6%), ependimomas (6,7%) e outros subtipos (9,6%).^{31, 33} Além disso, os padrões de diferenciação e anaplasia (proliferação microvascular, necrose, atividade mitótica e anaplasia nuclear) também davam suporte à classificação em graus de malignidade que variam de I a IV, sendo o grau I o comportamento menos maligno como em astrocitomas pilocíticos, frequentes em crianças e que apresentam um melhor prognóstico.^{34, 35} Uma das limitações deste formato está relacionado à variabilidade no diagnóstico dos observadores, que incluíam um grau de subjetividade nas classificações, devido à heterogeneidade intratumoral presente nas amostras com similaridades^{36, 37}.

O melhor entendimento das alterações moleculares presentes nos tumores, permitiu à Organização Mundial de Saúde (OMS) introduzir uma classificação integrada, unindo os componentes histológico e molecular permitindo desta forma, um diagnóstico mais preciso dos gliomas.³⁵ A nova classificação também tornou tumores difusos, com origens celulares distintas (como os astrocitomas difusos e oligodendrogliomas) mais similares, separando desta forma, tumores com padrão de crescimento mais circunscrito ou sem alterações em genes “drivers” como mutações de *IDH1/2* e *BRAF* ou a perda do cromossomo 1p19q (Figure 6). Aqueles tumores não testados molecularmente ou com os resultados permanecendo inconclusivos, foi criado a categoria de tumores não especificados (NE).



Fonte: modificado de Reifenberger et al³⁸

Figura 6 - Diagrama representativo da classificação histológica e molecular integrada de gliomas difusos de acordo com a classificação dos tumores do sistema nervoso central de 2016 da OMS.^{35,38} Além da classificação histológica, os gliomas difusos são avaliados para status de *IDH1/2* e *ATRX* e codeleção de *1p/19q*. Gliomas com *IDH*-tipo selvagem localizados em estruturas da linha média (tálamo, tronco cerebral ou medula espinhal) são adicionalmente testados para mutações de histona-H3-K27M. Linhas tracejadas indicam subgrupos menores

de tumores com respectivos diagnósticos. * A expressão de ATRX nuclear é mantida na maioria dos astrócitos grau II ou III com IDH-selvagem.

1.3.1 Tratamento

Antes do surgimento da classificação baseada em perfis moleculares, os tumores eram definidos para tratamento de acordo com variáveis clínicas e similaridades morfológicas, mas que geralmente apresentam perfis genéticos distintos. De forma geral, o primeiro passo no tratamento dos gliomas se baseia na ressecção cirúrgica, a mais ampla possível. O foco é a retirada do tumor afim de diminuir o seu tamanho para diagnóstico preciso, planejamento do tratamento e, em alguns casos eliminar o tumor.^{31,39} A radiação, assim como a quimioterapia após a ressecção cirúrgica é utilizada na redução dos tumores com ressecção incompleta levando a um aumento da sobrevida global dos pacientes com gliomas de baixo grau. Em relação aos gliomas de alto grau, a exemplo dos glioblastomas, a opção de tratamento padrão tem sido a ressecção cirúrgica, o mais ampla possível, seguido de um regime combinado de radioterapia e quimioterapia adjuvante com agentes alquilantes como a temozolamida (TMZ).

40-43

A TMZ é um quimioterápico alquilante de DNA com ação sobre o crescimento celular e reparação do ciclo celular, metilando as posições N⁷ e O⁶ da base nitrogenada guanina além de metilar a posição N³ do sítio da adenina. A ação do fármaco leva a alterações estruturais no DNA, impedindo a ação dos mecanismos de reparo de DNA celular, comprometendo as funções vitais para a célula e resultado no processo de apoptose e morte celular.⁴⁴⁻⁴⁶ A presença da metilação em *MGMT* tem sido utilizado como marcador terapêutico no tratamento com TMZ. A enzima O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (*MGMT*) é uma enzima reparadora de DNA atuando na retirada de grupos metil da posição O⁶ das moléculas de guanina, induzidos por agentes alquilantes. Contudo, a metilação do promotor do gene *MGMT* resulta na falha transcricional do gene e portanto, aumentando a sensibilidade destas células à agentes alquilantes como a TMZ, aumentando desta forma a eficácia do tratamento, se tornando o *MGMT* um importante biomarcador no direcionamento do tratamento aos glioblastomas.^{47, 48} Fatores prognósticos como idade,⁴⁷ qualidade de vida e estado de saúde geral, devem ser levados em consideração na definição de tratamento a ser seguida, já que

estes pacientes acabam sofrendo diversos efeitos colaterais. Apesar do avanço terapêutico, a maioria dos casos continuam incuráveis, se tornando um grande desafio e estimulando a busca por melhoria no tratamento dos gliomas⁴⁹⁻⁵¹.

1.3.2 Gliomas com crescimento delimitado

Os gliomas com crescimento delimitado compreendem principalmente os astrocitomas pilocíticos (PAs, grau I), xantastrocitomas pleomórficos (PXAs, grau II) e os astrocitomas de células gigantes subependimais (SEGAs, grau I).³⁵ Estes tumores apresentam maior frequência em crianças e jovens adultos, diminuindo com o avanço da idade³¹, apresentando como características marcantes, o crescimento lento e circunscrito a determinada região do cérebro, além de raramente apresentarem características de anaplasia (atipia celular, alta atividade mitótica, necrose), apesar de se observar modificações à nível celular, segundo o subtipo histológico. O astrocitoma pilocítico é o representante mais relevante deste grupo, com aproximadamente 5,1% dos casos de glioma e o tumor mais frequente na faixa etária de 0-19 anos com aproximadamente 30% dos casos⁵². Estes tumores apresentam alterações moleculares frequentemente relacionados aos genes da via da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK).^{33, 53, 54} A fusão dos genes *KIAA1549* e *BRAF* (*KIAA1549-BRAF*), resultado de rearranjos no cromossomo 7q34, é a alteração mais observada em PAs (~70%) gerando a ativação permanente de *BRAF*.^{55, 56} Em aproximadamente 60% dos xantastrocitomas pleomórficos há mutação de *BRAF*^{V600E}, que pode vir acompanhada da perda homozigótica dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*.⁵⁷ Também são descritas neste grupo de tumores, alterações em diversos genes da via das MAPKs, como as mutações de *KRAS*, *PTPN11*, *FGFR1* e *BRAF*^{V600e}, além de fusões relacionadas ao gene *NTRK*.^{11, 56, 58}

1.3.3 Gliomas difusos

Os gliomas difusos são tumores malignos mais frequentes nos adultos, sendo a maioria composta por glioblastomas (~57%).^{11, 31} De forma geral estes tumores incluem: o astrocitoma difuso (AD, grau II), astrocitoma anaplásico (AA, grau III), glioblastoma (GBM, grau IV)

oligodendroglioma (OD, grau II), oligodendroglioma anaplásico (ODA, grau III), oligoastrocitoma (OA, grau II) o oligoastrocitoma anaplásico (OAA, grau III) e o glioma difuso de linha média (grau IV), H3 K27M.^{35, 37} A classificação histológica, tanto dos astrocitomas quanto dos oligodendrogliomas, levam em consideração características específicas, além de critérios como: grau de atipia celular, frequência de mitose, proliferação endotelial (vascularização) e a presença de necrose nos tumores³³. A classificação histológica, levando em consideração a morfologia dos tumores auxilia principalmente no diagnóstico inicial, possibilitando aos neuropatologistas definirem a melhor conduta a seguir, principalmente com os avanços no sistema de classificação baseando-se em marcadores moleculares.⁵⁹⁻⁶¹

Desde de 2016, a OMS incluiu a avaliação de IDH como parte do diagnóstico integrado de astrocitomas, oligodendrogliomas e glioblastomas.³⁵ A família das enzimas isocitrato desidrogenases (IDHs) são responsáveis pela conversão do isocitrato em α -cetoglutarato, convertendo a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) na sua forma reduzida NADH, atuando diretamente no ciclo de Krebs.⁶² As mutações em *IDH* atingem entre 65 e 90% dos gliomas de baixo grau (GBG), aproximadamente 5-10% dos glioblastomas e quase a totalidade dos oligodendrogliomas.^{31, 33} A grande maioria das mutações (~90%) são causadas pela substituição do aminoácido arginina (R) pela histidina (H) no códon 132 (R132H) dentro do gene *IDH1*. Menos frequente, as mutações no gene *IDH2* ocorrem no códon 172 pela substituição da arginina (R) pela lisina (K) R172K.^{63, 64} Esta mutação, confere uma mudança no sítio ativo resultando em uma nova função da enzima que passa a converter α -cetoglutarato em 2-hidroxi-glutarato (2HG).⁶² A presença da mutação de *IDH* parece ocorrer nos primeiros estágios do desenvolvimento dos gliomas e apesar de não completamente elucidado, ela confere um melhor prognóstico aos pacientes independente do grau histológico e tratamento utilizado.^{51, 64} A codeleção de 1p/19q tem sido descrito como um importante marcador molecular para oligodendrogliomas.^{65, 66} Ela ocorre devido à perda de parte dos cromossomos 1p e 19q durante a sua translocação t(1p;19q)^{67, 68} e sua presença em oligodendrogliomas e oligodendrogliomas do tipo anaplásico atribui uma melhor sobrevida aos pacientes quando tratados com radiação ou quimioterapia.^{66, 69}

Nos oligodendrogliomas com codeleção de 1p/19q, também têm sido descrito a presença de mutações em genes supressores tumorais presentes nos cromossomos 1p

(Proteína 1 de ligação ao FUSE – FUBP1) e 19q (repressor transcricional capicua - CIC).^{17, 66, 70} Por fim, a combinação destes dois biomarcadores (IDH e 1p19q), além da avaliação adicional da mutação dos genes da síndrome da α -talassemia/retardo mental ligado ao X (*ATRX*), *TP53* e do promotor da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*), podem confirmar respectivamente os componentes astrocítico e oligodendroglial dos gliomas. No caso dos gliomas mistos como os oligoastrocitomas, a nova classificação da OMS preconiza seu uso apenas quando o diagnóstico molecular não está disponível, sendo denominado não especificado (NE), assim como para outros gliomas com dificuldades ou falta de classificação.³⁵

No caso dos gliomas difusos com presença de IDH-selvagem, estudos têm demonstrado que vários destes tumores apresentam prognóstico desfavorável se assemelhando em agressividade e sobrevida, aos tumores com maior malignidade como os GBMs, sendo por vezes são denominados gliomas pré-GBM.^{71, 72}

1.3.4 Glioblastoma

Cerca de 80% dos astrocitomas difusos apresentam mutação de *IDH*, onde se situam a maioria dos gliomas de baixo grau. Dentro dos 20% restantes, abriga-se 90% dos glioblastomas, o tumor de maior malignidade entre os astrocitomas difusos. Os glioblastomas são os gliomas mais frequentes (~57%), com incidência aumentando de acordo com a idade, possuindo pico acima de 65 anos, apesar de se manifestar em todas as idades.^{31, 73, 74}

Os GBMs se diferenciam dos demais astrocitomas por serem bastante heterogêneos e apresentarem principalmente aumento na proliferação vascular em torno do tumor e necrose. Estes tumores também possuem crescimento rápido e capacidade altamente infiltrativa no parênquima cerebral, impactando sobremaneira a sobrevida média destes pacientes, que, em 5 anos, é de aproximadamente 6%, comparado com 94% nos PAs.^{31, 75} Tradicionalmente, os GBMs tem se dividido em GBM primário (de novo, ~90% dos casos) ou secundário (desenvolvimento a partir de GBG pré-existent, 10% dos casos).^{35, 76, 77}

Atualmente, assim como nos demais gliomas difusos, os GBMs têm sua classificação baseada na presença ou ausência de mutação de *IDH*, tornando este diagnóstico mais importante que a definição clínica de GBM primário ou secundário.⁷⁸⁻⁸⁰ Os GBMs com presença de mutação de *IDH* são normalmente menos agressivos ocorrendo em pacientes

mais jovens conferindo um melhor prognóstico ao paciente.⁸⁰ Este subgrupo apresenta entre as alterações moleculares mais frequentes: mutação de *TP53*, perda/mutação de *PTEN*, amplificação de *PDGFRA*, perda de heterozigossidade do cromossomo 10q e 17p, além de aumento da expressão do promotor de *TERT* e presença de metilação do DNA.^{78, 81} Por outro lado, os tumores com presença de *IDH* selvagem, ocorrem em pacientes idosos, sendo mais agressivos e apresentando diversas alterações moleculares, entre elas: amplificação de *EGFR*, amplificação de *MDM2*, mutação de *PTEN*, amplificação/mutação de *PI3K*, superexpressão de *VEGF* e deleção de *CDKN2A/B*.^{61, 72, 80, 82-84}

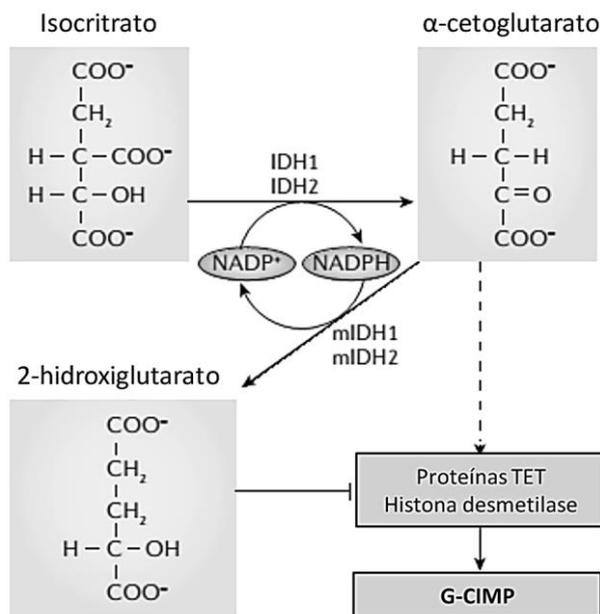
Paralelamente à classificação molecular da OMS que leva em consideração a presença de mutação de *IDH*, o grupo de Wang et al. revisou aproximadamente 500 GBM's *IDH* selvagem de acordo com a expressão gênica que então permitiram a classificação dos GBM's em subtipos: clássico, mesenquimal e proneural (Tabela 1).^{83, 85, 86} De forma geral, os GBM's do subtipo clássico, possuem geralmente o pior prognóstico, apresentando alterações moleculares frequentemente associadas à amplificação/mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) e a deleção de *CDKN2A/B*. A mutação de *NF1* está presente no subtipo mesenquimal, com sua inativação relacionada a ativação de macrófagos/micróglia.

O grupo de GBMs com subtipo proneural possui amplificação de *PDGFRA* e mutação em *IDH1*, que leva os pacientes a terem melhor prognóstico além de estar associado ao desenvolvimento de gliomas com fenótipo metilador de ilhas CPG (G-CIMP) (Figura 8).^{74, 86, 87}

Tabela 1 - Sumário dos subtipos moleculares de glioblastomas com as principais alterações moleculares.^{86, 88}

| GBM – Clássico | GBM – Mesenquimal | GBM - Proneural |
|--|-------------------------------------|--------------------------------|
| Amplificação <i>EGFR</i> | Perda de <i>NF1</i> | Amplificação <i>PDGFRA</i> |
| Mutação de <i>EGFR</i> | Mutação de <i>NF1</i> | Mutação de <i>IDH1</i> |
| Perda de <i>PTEN</i> | Ativ. da via <i>NfκB</i> | Mutação de <i>TP53</i> |
| Perda de <i>CDKN2A/B</i> | Perda de <i>TP53</i> | Expressão de <i>OLIG2</i> |
| Amplificação do cromossomo 7 | Mutação de <i>TP53</i> | Perda de <i>CDKN1A</i> |
| Perda do cromossomo 10 | Mutação de <i>PTEN</i> | Perda de <i>CDKN2A/B</i> |
| Superexpressão <i>Nestin</i> | Expressão (<i>MET/CD44/Ch3L1</i>) | Expressão genes proneurais: |
| Ativ. da via <i>Notch</i> e <i>SHH</i> | | <i>SOX/DCX/DLL3/ASCL1/TCF4</i> |

Abreviações: Ativ: Ativação. *EGFR*: Receptor do fator de crescimento epidérmico; *PTEN*: Fosfatase homologa à tensina; *CDKN2A*: Inibidor de cinases ciclina dependentes 2; *CDKN2B*: Inibidor de cinases dependentes de ciclinas 2B; *SHH*: Sonic hedgehog; *NF1*: Fator de neurofibromatose 1; *NfκB*: Fator nuclear kappa B; *TP53*: Proteína de tumor 53; *Ch3L1*: chitinase3-Like 1; *IDH1*: Isocitrato desidrogenase 1.



Fonte: modificado de Weller et al.¹¹

Figura 7 - Modificação bioquímica a partir da mutação *IDH* associadas ao glioma. *IDH* mutada produz menos α -cetoglutarato e NADPH , resultando em estresse oxidativo, anormalidades de

metilação e surgimento do fenótipo de metilador de ilha CpG de glioma (G-CIMP). A seta tracejada indica a função de α -cetoglutarato como cofator para a translocação da proteína ten-eleven translocation (TET) e histona desmetilases.

Os GBMs com esta assinatura molecular (G-CIMP+), normalmente apresentam sobrevida favorável e similaridades moleculares com gliomas de baixo grau, quando comparados aos do subgrupo G-CIMP –, que apresentam comportamento molecular e clínico similares aos GBMs IDH selvagem.^{47, 87, 89} Recentemente, Cecarelli et al.^{74, 90} identificaram dentro do subtipo IDH-mutado/G-CIMP + dois subgrupos, denominados G-CIMP-low e GCIMP-high. Os GBMs G-CIMP-high estão presentes em 55% dos casos, apresentando alta taxa de metilação e um melhor prognóstico ao tratamento quimioterápico. Já os GBMs G-CIMP-low possuem uma menor taxa de metilação e pior prognóstico.⁷⁴

1.4 O gene *MTAP*

O gene *MTAP* (EC 2.4.2.28) está localizado no braço pequeno do cromossomo 9, na região 9p21.3, de 21,802,636 até 21,865,971 (5' -> 3'), localizado próximo aos genes *CDKN2A* que codificam *p16^{ink4A}* e *p14^{ARF}* e *CDKN2B*, que codifica *p15*. O gene *MTAP* consiste de 8 éxons e 7 íntrons que codificam a proteína com 283 aminoácidos e 32 kDa.(Figura 9).⁹¹⁻⁹³

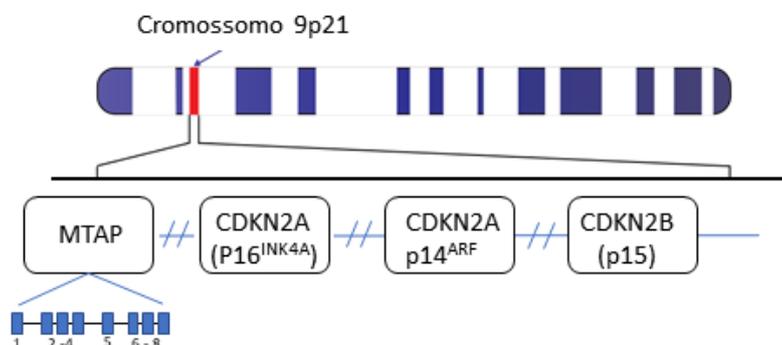
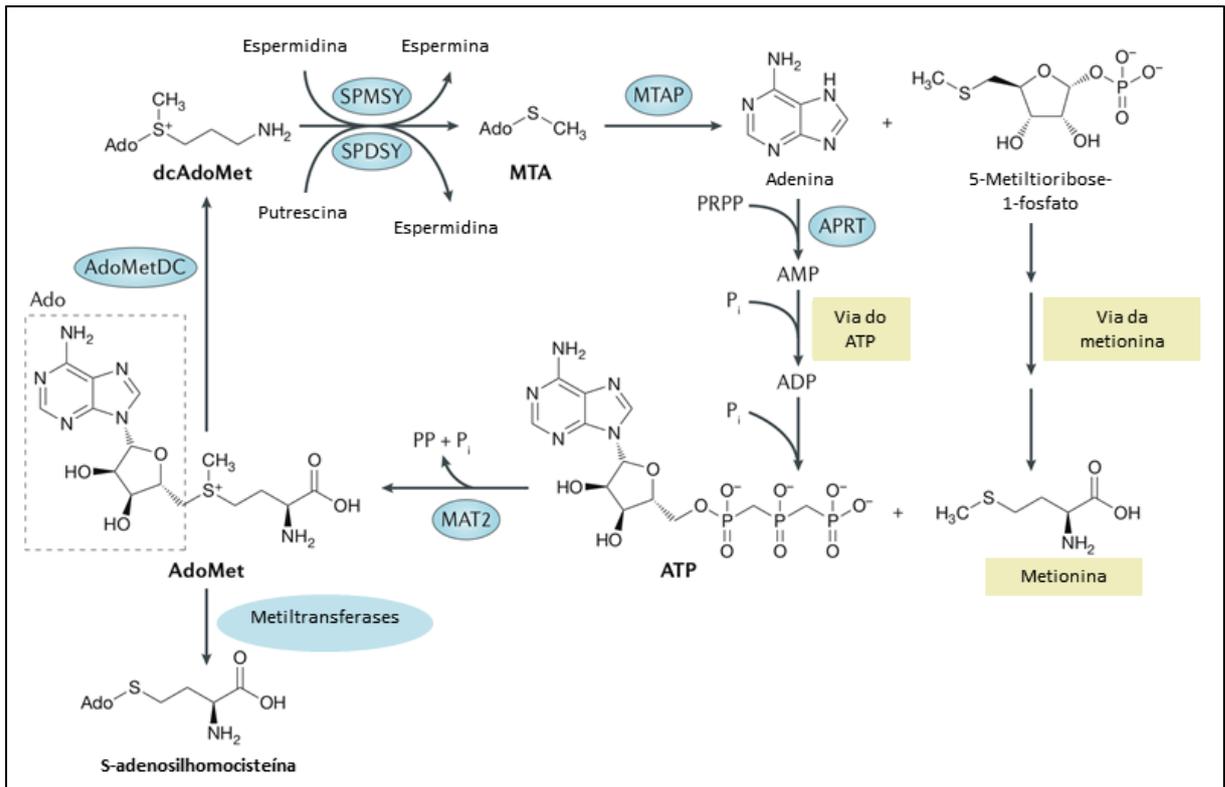


Figura 8 - Localização genômica do gene *MTAP*, com ênfase nos seus 8 éxons.

A enzima MTAP está presente em todos os tecidos atuando no metabolismo das poliaminas com importante função na reciclagem de adenina e metionina. Ela catalisa a fosforilação de 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina (MTA) em metiltioribose-1-fosfato (MTR-1P) que é então convertido após uma série de reações, em metionina (Figura 10) .⁹⁴ Adenina é reciclada, sendo convertida em nucleotídeos através da ação de fosforibosil transferases tendo grande importância na via da reciclagem das purinas.⁹⁵



Fonte: modificado de Casero et al⁹⁶

Figura 9 - Via metabólica das poliaminas em que a enzima MTAP está envolvida. A metiltioadenosina (MTA) é resultado da via das poliaminas e metabolizada pela enzima MTAP para produção de adenina necessária para síntese de DNA e 5-metiltioribose -1 fosfato (MTR-1P) para síntese de metionina. A Adenina produzida é convertida para adenosina trifosfato (ATP) via ação da enzima adenina fosforibosil transferase (APRT). Abreviações: SPMSY: Espermina sintase, SPDSY: Espermidina sintase; dcAdomet: S-adenosilmetionina descarboxilase, PRPP: Fosforibosil pirofosfato, AMP: Adenosil monofosfato, ADP: Adenosil difosfato, ATP: Adenosil trifosfato, MAT2: Metionina adenosiltransferase .

A perda de MTAP leva à diminuição das funções da via das poliaminas alterando os níveis de putrescina. O aumento da concentração de MTA no interior celular que atua como potente inibidor de espermina e espermidina sintase, duas enzimas chave nesta via.^{95,96}

1.5 Expressão de *MTAP* em tumores

Por apresentar grande importância no processo de reciclagem de adenina e metionina, assim como contribuir para a via das poliaminas, a enzima MTAP está expressa em praticamente todas as células e tecidos do organismo humano.^{97, 98} Por outro lado, em tumores, estudos têm demonstrado ausência de expressão devido a deleção do gene ou a fatores epigenéticos.⁹⁹⁻¹⁰¹

Como anteriormente referido, o gene *MTAP* está localizado ao lado do gene supressor tumoral *CDKN2A* (p14/p16) o que faz com que ele acabe por sofrer codeleção entre 35 e 70% dependendo do tumor.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Entretanto, em muitos tumores, esta ligação parece não ser exclusiva.^{105, 106} Normalmente, a deleção homozigótica de *MTAP* (9p21) tem sido descrita em diferentes tipos tumorais, tais como mesotelioma¹⁰¹, câncer pancreático¹⁰⁷, sarcoma^{52, 108}, câncer gástrico^{109, 110}, linfoma de células T¹⁰⁵ e leucemia linfóide e mielóide aguda¹¹¹ devido principalmente à deleção da região do cromossomo 9, local onde se localiza o gene *MTAP*.¹⁰²

Mecanismos epigenéticos também podem inibir a expressão de *MTAP*, como descrito em tumores como melanomas e câncer hepático.^{112, 113} A deleção de *MTAP* acaba por interferir diretamente na via das poliaminas, resultando no aumento da expressão da enzima ornitina descarboxilase (ODC). Este efeito, leva a interferência na via de reciclagem de metionina e conseqüentemente na tumorigênese.^{107, 114-116} Além disso, a deleção da enzima aumenta a concentração de MTA, que pode estimular efeitos tumorigênicos, como a migração de células tumorais.⁹⁵

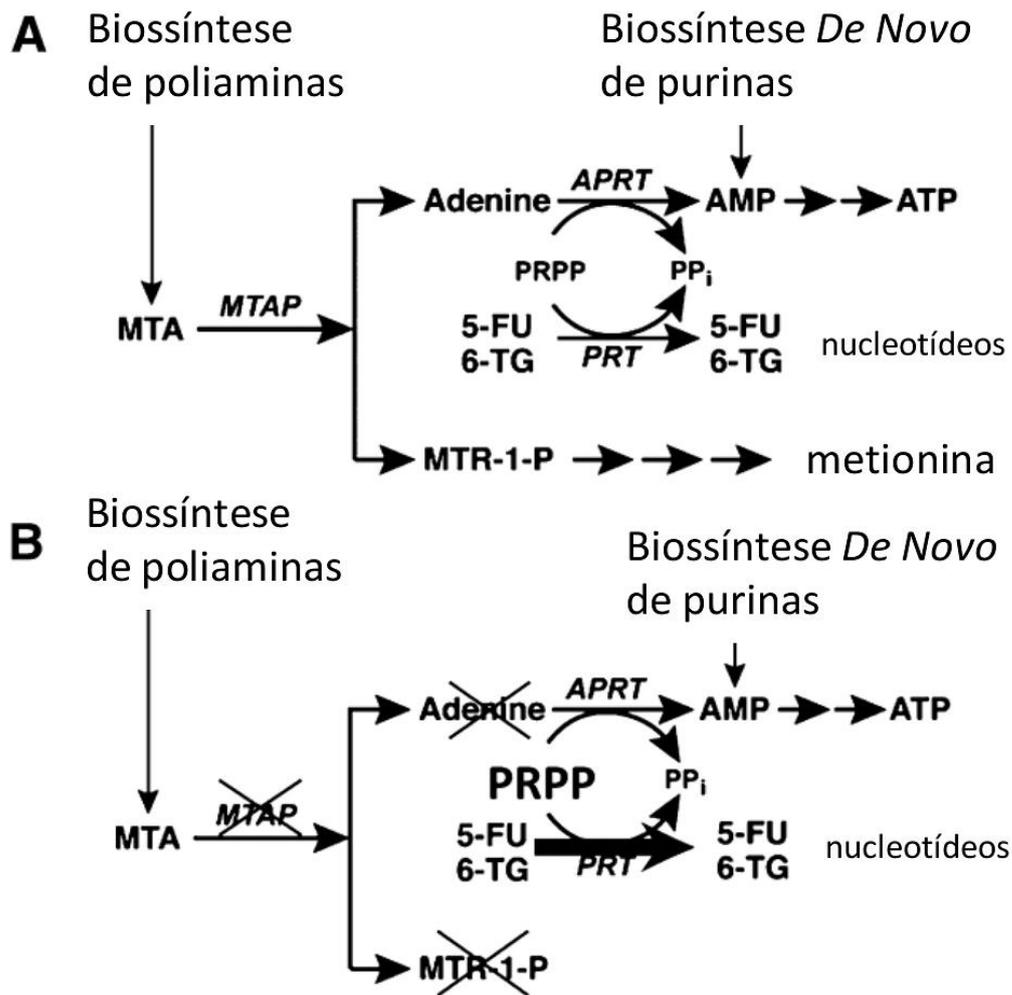
Em tumores cerebrais, a perda de expressão de *MTAP* tem sido descrita em gliomas difusos, mas principalmente em GBMs, sendo aproximadamente 50% dos pacientes adultos.^{117, 118} Um estudo desenvolvido pelo nosso grupo,¹¹⁹ com 69 casos de astrocitoma pilocítico, demonstrou que a perda de expressão de *MTAP* nestes pacientes alcançava apenas 15% dos casos. Estes dados juntamente com dados da literatura, sugerem que a perda de

expressão de *MTAP* está associada a gliomas difusos e de maior grau de malignidade. Em trabalho recente, nosso grupo analisou uma série de astrocitomas por meio de análise de aCGH e validação *in silico* revelou que a perda de expressão do gene *MTAP* está frequentemente presente nos pacientes com GBM.¹²⁰ Já em pacientes pediátricos, Frazão e et al.¹²¹ demonstraram que pacientes diagnosticados com glioma de alto grau apresentam redução de expressão de *MTAP*, demonstrando a associação entre a deleção homozigótica de *MTAP* e a sua perda de expressão.

Estudos têm indicado que o gene *MTAP* atua como supressor tumoral e que sua reexpressão em alguns tecidos, como em células de adenocarcinoma mamário, promove a perda da ancoragem *in vitro* e da capacidade tumorigênica em camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID).¹²² A expressão de *MTAP* também está relacionada com importantes vias celulares, tais como: adesão, comunicação e migração celular. Sua inibição leva ao aumento da expressão de *IL-8* e das enzimas MMP-1 e MMP-9, que estão associadas à invasão celular e ao aumento da agressividade tumoral⁹⁵.

A falta desta enzima pode ser utilizada como uma nova estratégia de tratamento para glioblastomas, utilizando-se fármacos que atuem na via da síntese de novo de purinas. Fármacos desenvolvidos como análogos de purinas e pirimidinas tais como 5-fluorouracil (5-FU), 6-thioguanina (6TG) e 6-mercaptopurina (6MP), atuam *in vivo* sendo convertidas em análogos tóxicos de nucleotídeos, desregulando o metabolismo do DNA, causando inibição da divisão celular e consequente morte da célula¹²³. Como consequência, as células tumorais que apresentam deleção do gene *MTAP* se tornam mais sensíveis à ação desses fármacos¹²⁴.

Foi também demonstrado a relação entre a deficiência de *MTAP* e falta de purinas e metionina. Células com deficiência na proteína *MTAP* são mais sensíveis a metotrexato (MTX), 5,10-dideazafolato e L-alanosina¹¹³ (Figura 11).



Fonte: modificado de Munshi et al.¹²⁵

Figura 10 - Função enzimática de MTAP. A). Via metabólica em células com expressão normal de MTAP. B) Células com perda de expressão de MTAP são incapazes de reciclar adenina e dependem apenas da biossíntese *de novo* de purinas. Abreviações: 5-FU: 5-Fluorouracil; 6-TG: 6-thioguanina; MTA: metiltioadenosina; MTR-1-P: metiltioribose-1-fosfato; PRPP: 5' - fosforibosil-1-pirofosfato.

Porém, segundo alguns autores, um dos potenciais problemas associados a esta classe de fármacos são seus índices terapêuticos, já que não são altos o suficiente para o tratamento da maioria dos tumores sem que haja algum efeito colateral de toxicidade no organismo.¹²⁶

Uma das alternativas para melhorar o índice terapêutico é a busca de alvos específicos em vias metabólicas nas células tumorais, encontrando vias que protejam os tecidos normais do aumento da dose terapêutica, levando apenas as células tumorais à morte.¹²⁶ De fato,

Lubin e Lubin, demonstraram que a adição de MTA em células de fibroblastos com reexpressão de *MTAP* promove ação protetora contra os efeitos tóxicos de certos análogos de purinas, enquanto que em células com deleção no gene *MTAP* esse efeito protetor não permanece¹⁰⁴.

O substrato MTA clivado pela enzima, quando adicionado junto aos inibidores de síntese de purinas, mantém as células que expressam *MTAP* protegidas dos efeitos tóxicos desses agentes, diferentemente daquelas que não expressam.¹²⁶ Em modelos *in vivo*, tem sido demonstrado que o MTA possui efeito protetor contra danos no fígado e, mesmo em períodos longos, não revelou toxicidade aos tecidos. De forma semelhante, um estudo avaliando a administração oral de MTA na concentração de 600 mg/dia por um mês e 1600 mg/dia em voluntários, não demonstrou qualquer tipo de toxicidade.^{107, 127, 128} Em estudo recente, Tang et al.¹²⁹ utilizando modelo xenográfico, observaram que o tratamento com análogos de purina e pirimidina (2-fluoroadenina) tem demonstrado resultados promissores. Por outro lado, estudos também têm utilizado o consequente aumento da concentração de MTA intracelular como um mecanismo de morte celular. O aumento da concentração de MTA leva a inibição da proteína arginina N-metiltransferase 5 (PRMT5), e como consequência à morte celular.¹³⁰⁻¹³² A importância de *MTAP* na manutenção de metionina e ATP, pode ser utilizado como um potencial marcador terapêutico, já que em tumores de próstata, a expressão do gene mantém o fluxo de metionina, essencial para o crescimento tumoral.¹³³ Desta forma, a avaliação do uso de drogas alvo para inibir ou mesmo a deleção desta enzima possa ter potencial no tratamento de diversos tumores.

Neste contexto, a avaliação molecular da perda de expressão de *MTAP* em linhagens celulares de glioma assim como seus efeitos, se mostra oportuna. Da mesma forma, a busca por novas abordagens terapêuticas, como o uso de específicos da via de síntese de novo, se mostra potencialmente importante e pode constituir um grande auxílio no conhecimento e desenvolvimento de novas linhas de tratamento para pacientes acometidos por esta doença fatal.

2. JUSTIFICATIVA

A deleção homozigótica do gene *MTAP* tem sido descrito em diferentes tipos tumorais, tanto tumores hematológicos quanto tumores sólidos, incluindo os tumores cerebrais. A perda de expressão de *MTAP* nos gliomas é observada ao longo dos diversos subtipos, mas sobretudo em gliomas de alto grau como os glioblastomas, apresentando frequência superior à 40%. O glioblastoma é um tumor altamente agressivo, com taxa de mortalidade e tratamento ainda pouco eficazes, principalmente pela diversidade de alterações moleculares, o que acaba por levar o tumor a desenvolver resistência aos fármacos utilizados na rotina clínica. Estratégias terapêuticas tendo como alvo a presença de mutação ou deleção de genes, como observado com o gene *MTAP* têm sido propostos, dentre eles, aqueles com o uso de inibidores da síntese de novo de purinas e pirimidinas. No entanto, as alterações moleculares resultantes da modulação de *MTAP* são pouco conhecidas, assim como seu papel biológico no desenvolvimento dos glioblastomas. Este trabalho busca caracterizar a expressão deste gene em uma série de gliomas, além de, avaliar os efeitos de sua modulação em nível celular, propondo ainda a avaliação do seu uso como um possível biomarcador terapêutico para gliomas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Caracterizar as alterações moleculares de *MTAP* em gliomas, e determinar os efeitos da perda ou ganho de função do gene *MTAP*, além de avaliar o uso como biomarcador para resposta terapêutica utilizando agentes inibidores de síntese de novo de purinas e pirimidinas com o substrato MTA.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar *in silico*, a expressão de *MTAP* em glioblastomas e sua associação com a sobrevida dos pacientes nas bases de dados TCGA e Oncomine;
- Avaliar a expressão de *MTAP* em pacientes com diagnóstico de glioma, por meio de ensaio de imuno-histoquímica, correlacionando os dados moleculares com a evolução clínica dos pacientes;
- Caracterizar o status de expressão de *MTAP* em painel de linhagens comerciais e primárias de gliomas;
- Editar geneticamente (silenciar/expressar) o gene *MTAP* em linhagens celulares selecionadas e avaliar os efeitos biológicos basais da perda e do ganho de função gênica, além de avaliar a expressão diferencial de genes associados ao câncer, assim como nos processos de proliferação, migração e invasão celular;
- Avaliar a citotoxicidade (IC50) dos agentes inibidores de síntese de novo de purina e pirimidina, nas linhagens celulares editadas para o gene *MTAP*, na ausência e presença de MTA;
- Avaliar os efeitos biológicos dos agentes inibidores de síntese de novo de purina e pirimidina no ciclo celular, proliferação, migração e invasão celular nas linhagens editadas para o gene *MTAP*;

- Comparar o potencial terapêutico dos agentes inibidores de síntese de novo de purina e pirimidina com o agente quimioterápico usado na prática clínica para o tratamento de GBM, TMZ.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma do projeto

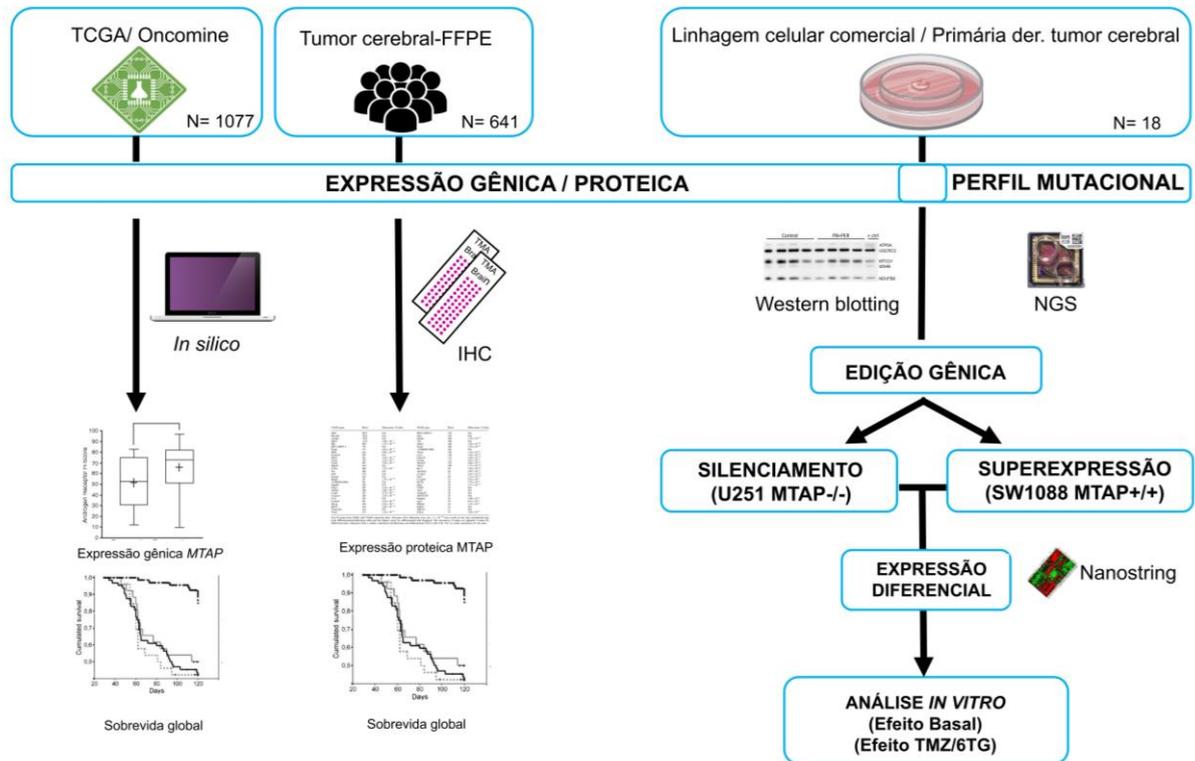


Figura 11 – Figura representativa do delineamento experimental do projeto de pesquisa “Caracterização molecular de *MTAP* (Methylthioadenosine Phosphorylase) e avaliação do seu potencial terapêutico em gliomas”.

4.2. Casuística

Estudo retrospectivo de 641 amostras de pacientes com diagnóstico de glioma de distintos graus de malignidade, em especial de glioblastomas submetidos à cirurgia para ressecção tumoral e inclusão em blocos de parafina. As características clínico-patológicas dos pacientes estão reunidas nas tabelas 2 e 3. A distribuição dos tumores se manteve aproximadamente constante para homens e mulheres. A idade dos participantes variou entre 0,3 e 82,8 anos com mediana de 52 anos. Já em relação a grupo por idade, foi observado que

19,6% (125) pacientes eram pediátricos e 513 (80,4%) adultos e 3 pacientes sem dados de idade. A sobrevida global da série foi de 9,58 meses (mediana), com diferença de acordo com o subtipo histológico. Em astrocitomas, os dados demonstram que a sobrevida média em dois anos variou de 98% nos astrocitomas pilocíticos até 11,2% em glioblastomas (Tabela 2). Nos demais subtipos histológicos, não foram observados relação entre a sobrevida e o subtipo histológico (Tabela 3). As amostras parafinadas foram obtidas dos departamentos de patologia do Hospital de Câncer de Barretos do hospital A.C Camargo Câncer Center, e *Institute of Cancer Research* (Sutton, Surrey, UK), do período de 1980 até 2013. A coleta de dados clínico-patológicos de interesse foi realizada por meio de ficha individual padronizada (Anexo A).

Tabela 2 – Características clínico-patológicas dos pacientes com diagnóstico de glioma nos diferentes subtipos histológicos.

| Características | A.P* | A.D, NE | A.A, NE | GBM, NE |
|----------------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| Gênero | N=69 | N=17 | N=24 | N=451 |
| Feminino | 31 (44,9%) | 9 (52,9%) | 6 (25%) | 177 (39,2%) |
| Masculino | 38 (55,1%) | 8 (47,1%) | 18 (75%) | 274 (60,8%) |
| Idade, (a) | N=69 | N=17 | N=24 | N=464 |
| Média (variação) | 11,63 (0,3-53,4) | 41,1 (26-70) | 37,1 (1-75,3) | 53,1 (1-82,8) |
| Mediana | 9,2 | 37,0 | 38,4 | 57,0 |
| Localização tumoral | N=69 | N=16 | N=11 | N=277 |
| Lobo frontal | 0 | 8 (50%) | 4 (36,3%) | 76 (27,5%) |
| Lobo temporal | 1 (1,45%) | 1 (6,25) | 1 (9,1%) | 64 (23,1%) |
| Lobo Parietal | 1 (1,45%) | 0 | 1 (9,1%) | 40 (14,4%) |
| Lobo Occipital | 2 (2,9%) | 2 (12,5%) | 1 (9,1%) | 7 (2,5%) |
| Cerebelo | 36 (52,1%) | 0 | 2 (18,2%) | 3 (1,1%) |
| Outro | 29 (42,1%) | 5 (31,25%) | 2 (18,2%) | 87 (31,4%) |
| KPS | N=65 | N=14 | N=2 | N=152 |
| <70 | 23 (35,4%) | 0 | 1 (50%) | 74 (48,7%) |
| ≥70 | 42 (64,5%) | 14 (100%) | 1 (50%) | 78 (51,3%) |
| Resecção | N=69 | N=12 | N=16 | N=378 |
| Biopsia | 0 | 0 | 0 | 19 (5,0%) |
| Craniotomia | 69 (100%) | 12 (100%) | 16 (100%) | 359 (95,0%) |
| Radioterapia | N=67 | N=16 | N=13 | N=362 |
| Sim | 5 (7,5%) | 9 (56,25%) | 12 (92,3%) | 283 (78,1%) |
| Não | 62 (92,5%) | 7 (43,75%) | 1 (7,7%) | 79 (21,9%) |
| Quimioterapia | N=68 | N=17 | N=13 | N=363 |
| Sim | 10 (14,7%) | 3 (17,6%) | 4 (30,8%) | 100 (27,5%) |
| Não | 58 (85,3%) | 14 (82,4%) | 9 (69,2%) | 263 (72,5%) |
| Sobrevida global a | | | | |
| Média (%) | 98,2 | 50,8 | 64,4 | 11,2 |

Abreviaturas: A.P: Astrocitoma pilocítico; A.D: Astrocitoma difuso; A.A: Astrocitoma anaplásico; GBM: Glioblastoma; a: anos; m: meses; NE: Não especificado; a: Probabilidade de sobrevida em 2 anos; * Previamente reportado por Becker et al¹¹⁹.

Tabela 3 – Características clínico-patológicas dos pacientes com diagnóstico de glioma nos diferentes subtipos histológicos.

| Características | PXA | GDLM | Astrob. | O.D (NE) | O.D.A (NE) | O.A (NE) | O.A.A (NE) |
|--|-------------|-------------|-------------|--------------|---------------|-------------|------------|
| Gênero | N=5 | N=4 | N=1 | N=8 | N=38 | N=1 | N=1 |
| Feminino | 5 (100%) | 2 (50.0%) | | 6 (75%) | 15 (39.5%) | 0 | 0 |
| Masculino | 0 | 2 (50.0%) | 0 | 2 (25%) | 23 (60.5%) | 1(100%) | 1(100%) |
| Idade, (a) | N=5 | N=4 | N=1 | N=8 | N=44 | N=1 | N=1 |
| Média (variação) | 13.8 (5-18) | 6.17 (3-10) | 10.5 | 41.7 (15-72) | 42.9 (5-69.2) | 19.1 | 48.0 |
| Mediana | 15.0 | 5.8 | - | 37.0 | 42.5 | - | - |
| Localização tumoral | N=5 | N=4 | N=1 | N=3 | N=6 | N=1 | N=0 |
| Lobo Frontal | 1 (20%) | 0 | 0 | 0 | 3 (50%) | 0 | 0 |
| Lobo Temporal | 3 (60%) | 0 | 0 | 1 (33,4%) | 0 | 0 | 0 |
| Lobo Parietal | 1 (20%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lobo Occipital | 0 (%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cerebelo | 0 (%) | 4 (100%) | 1 (100%) | 2 (66,6%) | 3 (50%) | 1 (100%) | 0 |
| Outro | | | | | | | |
| Sobrevida global^b, (%) | N=5 80,0 | N=4 25,0 | N=1 20.5 | N=0 - | N=39 66,8 | N=1 - | N=0 - |
| Média | | | | | | | |

Abreviação: a: anos; Astrob. : Astroblastoma; m: meses; PXA: Xantastrocitoma pleomórfico; GDLM: Glioma difuso de linha média; O.D: Oligodendroglioma; O.D.A: Oligodendroglioma anaplásico; O.A: Oligoastrocitoma; O.A.O: Oligoastrocitoma anaplásico; NE: Não especificado; b: Probabilidade de sobrevida em 2 anos

4.3 Análise *in silico* da expressão de *MTAP* e sua associação com sobrevida global

A análise *in silico* da expressão de *MTAP* por meio das técnicas de RNAseq e Hibridização Genômica Comparativa em microarranjos (aCGH), foi realizada utilizando pacote TCGA2STAT implementado no software R. Para a análise de aCGH, 350 casos de glioblastoma foram obtidos da base de dados CGH_SNP arrays¹³⁴. Baseado nos valores de *MTAP*, os pacientes foram estratificados em normal (n=181) (> 0,1), e deleção homozigótica de *MTAP* (n=169) (≤ -1,5). Para a análise de expressão de mRNA de *MTAP*, foram utilizados dados de

299 casos de glioblastoma. O valor da mediana da expressão de *MTAP* foi calculada considerando todas as amostras. Os pacientes com valores de expressão de *MTAP* 20% maiores que a mediana foram considerados positivos (n=138) e aqueles com valores 20% abaixo da mediana, considerados negativos (n=161). Finalmente para a análise do status de metilação, foram obtidos valores de 283 amostras.¹³⁴ Os pacientes foram estratificados em hipermetilados ($\beta > 0,5$) e hipometilados ($\beta \leq 0,5$). Além disso, para a análise do valor prognóstico de *MTAP*, foram utilizados dados obtidos de 5 banco de dados diferentes compilados no Compendio de Perfis de Transcriptoma de Câncer, Oncomine™ (Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI).¹³⁵⁻¹³⁸ As análises integradas *in silico* da expressão de CNA-*MTAP* e do status de metilação foram realizadas usando o pacote TCGA2STAT implementado no software R baixado de <https://www.r-project.org/>. Além disso, foi realizada análise *in silico* para avaliar a expressão de *MTAP* nos subtipos de glioblastoma no conjunto de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e Oncomine

4.4 Avaliação imuno-histoquímica de *MTAP*

Para a análise de imuno-histoquímica, foram avaliados cortes histológicos seriados de 4 μ M de espessura, montados sobre lâminas silanizadas obtidos a partir de blocos de *Tissue Microarray* (TMA), contabilizando 641 amostras tumorais de glioma, em duplicata. Além disso, foram adicionadas amostras de tecido normal, como controle de expressão para a proteína *MTAP*. Os cortes foram submetidos à pesquisa imuno-histoquímica de expressão de *MTAP*, utilizando-se o anticorpo policlonal anti-*MTAP* (ProteinTech, USA; diluição 1:300), pelo método streptoavidina-biotina-peroxidase de acordo com o protocolo sugerido pelos fabricantes (Leica Biosystems, UK). As análises histopatológicas e de imuno-histoquímica foram realizadas por patologistas que avaliaram a presença ou ausência de expressão da proteína no TMA. A análise da expressão de *MTAP* foi realizada por meio de avaliação de acordo com o seguinte critério: 0= negativo, 1= $\leq 25\%$ de células positivas, 2= 25-50% de células positivas, 3= $\geq 50\%$ de células positivas. A intensidade das reações foi definida como: 0= marcação negativa, 1= marcação fraca, 2= marcação moderada e 3= marcação forte. Os

casos apresentavam somatório dos scores (extensão e intensidade) variando de 0 à 3 foram considerados negativos e aqueles apresentando scores de 4 à 6 foram considerados positivos.^{55, 119}

4.5 Linhagens celulares

Neste trabalho, foram utilizadas diversas linhagens incluindo: uma linhagem derivada de astrócito normal (NHA) obtida do ECACC (*The European Collection of Authenticated Cell Cultures*), sete linhagens primárias de tumor cerebral (HCB2, HCB18, HCB27, HCB28, HCB29, HCB149 e HCB151), e 11 linhagens comerciais de glioma adultos e pediátricas, nomeadamente a linhagem U251 (obtida do laboratório Costello), GAMG obtida do DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*), RES259, SF188, UW479 e KNS42 (obtidas de Bax et al.⁵¹), e as linhagens A172, U87MG, SW1088, SW1783 e T98G obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*) (Tabela 4). As linhagens celulares, NHA, assim como as células pediátricas e linhagens celulares adultas de glioma (RES259, SF188, UW479, KNS42, U251, GAMG, A172, U87MG, SW1088, SW1783 e T98G) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, USA) e 1% de Penicilina/Streptomicina (P/S) (Life Technologies, USA) em frascos de cultura de 25 cm², na densidade média de 1X10⁶, a 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade, até atingirem confluência. Após confluência, as células foram tripsinizadas (solução tripsina 0,05% / EDTA 0,53 mM- TripLE Express (Life Technologies, USA), plaqueadas e mantidas nas mesmas condições acima descritas para os estudos de caracterização biológica e utilizadas nos estudos de resposta terapêutica. As linhagens primárias de glioma, (HCB27, HCB28, HCB18, HCB149, HCB29, HCB2 e HCB151) foram estabelecidas no Hospital de Câncer de Barretos (HCB) após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), obtido a partir do projeto 491/2011¹³⁹. Todas as linhagens celulares foram avaliadas para a infecção de micoplasma.

A autenticação das linhagens por meio da avaliação do perfil de short tandem repeat (STR) do DNA foi realizada pelo Laboratório de Diagnóstico Molecular no Hospital Câncer de Barretos (São Paulo, Brasil).

Tabela 4 – Painel de linhagens tumorais primárias e comerciais com diagnóstico de glioma.

| Tipo | Linhagem | Gênero | Idade | Subtipo histológico | Grau |
|-----------|----------|--------|---------|------------------------|------|
| Comercial | RES259 | F | 4 anos | Astrocitoma Difuso | II |
| Comercial | SF188 | M | 8 anos | Glioblastoma | IV |
| Comercial | UW479 | M | 13 anos | Astrocitoma anaplásico | III |
| Comercial | KNS42 | M | 16 anos | Glioblastoma | IV |
| Comercial | GAMG | F | 42 anos | Glioblastoma | IV |
| Comercial | U87MG | M | 44 anos | Glioblastoma | IV |
| Comercial | A172 | M | 53 anos | Glioblastoma | IV |
| Comercial | T98G | M | 61 anos | Glioblastoma | IV |
| Comercial | SW1783 | M | 68 anos | Astrocitoma anaplásico | III |
| Comercial | SW1088 | M | 72 anos | Astrocitoma anaplásico | III |
| Comercial | U251MG | M | 75 anos | Glioblastoma | IV |
| Primária | HCB 27 | M | 9 anos | Astrocitoma pilocítico | I |
| Primária | HCB 28 | F | 16 anos | ASCG | I |
| Primária | HCB 18 | F | 18 anos | Glioblastoma | IV |
| Primária | HCB 151 | M | 65 anos | Glioblastoma | IV |
| Primária | HCB 149 | F | 53 anos | Glioblastoma | IV |
| Primária | HCB 29 | F | 54 anos | Glioblastoma | IV |
| Primária | HCB2 | M | 49 anos | Glioblastoma | IV |

Abreviaturas: ASCG: Astrocitoma subependimal de células gigantes;

4.6 Análise do perfil mutacional de linhagens celulares de glioma utilizando a estratégia Ampliseq

Após expansão das culturas, o DNA das linhagens foi extraído com TRIzol® (Thermo Scientific, USA) segundo as orientações do fabricante¹⁴⁰. A quantificação das amostras de DNA foi realizada no equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, USA) pelo uso do Quant-IT dsDNA HS Assay kit (Life Technologies, USA). A qualidade das amostras foi verificada no equipamento NanoDrop®2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) pelos valores das razões

260/280 nm e 260/230 nm, respectivamente, como medidas primária e secundária de pureza do DNA. A integridade do DNA foi acessada pelo uso de eletroforese em gel.

Para as etapas descritas em seguida de preparo das bibliotecas, PCR em emulsão, enriquecimento e sequenciamento de nova geração, utilizamos o fluxo de trabalho recomendado pela Life Technologies para a plataforma Ion Torrent PGM.

O preparo das bibliotecas foi realizado a partir do uso do Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 e do Ion AmpliSeq™ Custom Panel, que contém primers para amplificação da região codificadora completa de 8 genes (*ATRX*, *EGFR*, *LZTR1*, *NF1*, *PTEN*, *RB1*, *SETD2* e *TP53*) e de éxons ou regiões hotspot de mais 13 genes (*BRAF*, *CHEK2*, *HIST1H3B*, *HIST1H3C*, *H3F3A*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS*, *MSH6*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PIK3R1* e *TRIM33*). Para a amplificação das regiões genômicas alvo foram feitas duas reações separadas por amostra, em função da divisão em dois pools do conjunto de pares de primers pela estratégia AmpliSeq. Cada reação conteve 4 µl de 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix, 10 µl de 2X AmpliSeq™ Custom Panel, 10-30 ng DNA genômico e água livre de nucleases para totalizar 20 µl. Para cada amostra, em uma das reações foi adicionado 1 µl de sample ID Panel. A amplificação foi realizada em termociclador ProFlex (Life Technologies, USA) usando o seguinte programa: 99°C por 2 minutos seguido por 20 ciclos de 99°C por 15 seg. e 60°C por 4 minutos. Após o término da amplificação, as amostras permaneceram a 10°C.

Para a digestão dos primers e fosforilação das extremidades dos amplicons, 2 µl do reagente FuPa foram adicionados em cada tubo. A seguir, o seguinte programa foi utilizado em termociclador: 50°C por 10 minutos, 55°C por 10 minutos, 60°C por 20 minutos e 10°C por no máximo 1 hora. Previamente à ligação dos adaptadores, para cada barcode a ser utilizado, foi realizada uma diluição na proporção 1:1:4, respectivamente, de Ion P1 Adapter, Ion Xpress™ Barcode e água livre de nuclease. Em seguida, para cada reação foram adicionados: 4 µl de Switch Solution, 2 µl da solução de adaptadores e 2 µl de DNA ligase. Em termociclador, o seguinte programa foi utilizado: 22°C por 30 minutos, 72°C por 10 minutos e 10°C por no máximo 1 hora. A purificação das bibliotecas foi realizada com Agencourt® AMPure® XP Reagent na proporção de 1,5X do volume de cada biblioteca (45 µl). Após homogeneização, a solução foi transferida para tubos LoBind (Eppendorf, USA) e mantida em temperatura ambiente por 5 minutos. Os tubos foram então colocados na rack magnética DynaMag™-2 Magnet por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 150 µl de etanol 70% recém preparado. Os tubos foram movidos 360° para lavagem das beads magnéticas e o

sobrenadante foi removido. Novamente foram adicionados 150 µl de etanol 70% para uma segunda lavagem. O sobrenadante e todo o excesso de etanol contido nas paredes dos tubos foram retirados. Os tubos foram mantidos abertos para secagem em temperatura ambiente por 5 minutos. Para a normalização da concentração das bibliotecas, utilizamos o Ion Library™ Equalizer Kit, segundo as orientações do fabricante. Antes da PCR em emulsão, cada biblioteca foi vigorosamente homogeneizada e 5 µl foram separados em um novo tubo.

A seguir, esta nova solução contendo um pool de todas as bibliotecas, foi novamente homogeneizada e 4 µl foram separados e adicionados em 21 µl de água livre de nucleases para a etapa seguinte de PCR em emulsão. As bibliotecas então foram clonalmente amplificadas com primers biotinizados nas Ion Sphere Particles (ISPs) por PCR em emulsão no equipamento OneTouch™ 2 (Life Technologies, USA) utilizando o Ion PGM Template OT2 200 kit. Em seguida, foi utilizado o Ion 318 Chip v2 para o carregamento e início do sequenciamento das amostras. Os dados das corridas foram processados por meio de ferramenta de análise específica para a plataforma Ion Torrent no *software Torrent Suite* versão 5.2 e 5.2.1. As etapas incluem: processamento e classificação dos dados brutos, processamento de sinal, chamada de bases, filtragem de reads, alinhamento das reads ao genoma de referência (UCSC build hg19) e geração de métricas da corrida (eficiência do carregamento do chip, contagem total e qualidade das reads). A chamada de variantes foi realizada pelo plugin *Torrent Suite Variant Caller* (TSVC) versão 4.2. A anotação das variantes foi realizada pelo software Ion Reporter versão 5.2.

4.7 Análise mutacional de TERT

A análise de mutações na região promotora do gene da transcriptase reversa da telomerase (TERT) foi realizado por PCR seguido de sequenciamento direto de Sanger. Resumidamente, a região promotora de TERT foi amplificada por PCR usando os seguintes iniciadores: 5'-AGTGGATTCGCGGGCACAGA-3' (para frente) e 5'-CAGCGCTGCCTGAAACTC-3' (reverso), levando a um produto de PCR de 235 pares de base contendo mutações C228T e C250T. A amplificação por PCR foi realizada com uma desnaturação inicial à 95 °C por 15 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento à 64 °C por 90 segundos, alongamento à 72 °C por 30 segundos e alongamento final à 72 °C por 7 minutos. A amplificação dos produtos de PCR foi confirmada

por eletroforese em gel. O seqüenciamento de PCR foi realizada usando o kit de seqüenciamento *Big Dye v3.1 Biosystems, cycle sequencing ready reaction kit* (Grand Island, NY, EUA) e analisado em ABI PRISM 3500 xL (Aplicado Biosystems, Grand Island, NY, EUA)

4.8 Avaliação da expressão de *MTAP* pela técnica de RT-qPCR

As linhagens celulares em cultura, tiveram o sobrenadante retirado dos frascos, lavados com DPBS (Tampão Fosfato Dulbecco), adicionados 1,5 mL de TRIzol® e homogeneizando para que todas as membranas fossem quebradas e o material genético exposto¹⁴⁰. Após a etapa de lise, as amostras foram homogeneizadas por 1 minuto e deixadas a temperatura ambiente por cinco minutos. Posteriormente, foram adicionados 200µL de NaCl 0,9% estéril e 300µL de clorofórmio, homogeneizado por inversão e centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos em centrífuga previamente refrigerada a 4 °C. Foram coletados 750 µL da fase superior contendo o RNA total e adicionados 750 µL de isopropanol. Posteriormente, as amostras foram colocadas à -20°C overnight. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 12.000 xg e então retirados o sobrenadante contido nos tubos e adicionados 1,5 mL de etanol 75%, sendo os tubos centrifugados por 5 minutos à 7.500 xg por duas vezes. Foram adicionados mais 1 mL de etanol 75% nas amostras e centrifugados por 5 minutos à 7.500 xg. O sobrenadante foi descartado e as amostras adicionadas em 20µL de água ultrapura, quantificado e qualificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, USA) e a qualidade do RNA checado pelo kit RNA 6000 nano assay (Agilent technologies, USA). 500 ng do RNA total isolado foi utilizado para síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do kit superscript III reverse transcriptase (Thermo Scientific, USA) de acordo com o protocolo fornecido. As reações de PCR em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas em um volume total de 20 µL, contendo 10 µL de 2X Fast SYBR Green PCR master mix (Thermo Scientific, USA), 100 ng (1µL) de cDNA, 10 µM (0,8 µL) de cada primer forward e reverse (*MTAP* forward: 5'-TCTTGTGCCAGAGGAGTGTG-3`); (*MTAP* reverse 5'-ACCATTGTCCCCTTTGAGTG-3`) e 7,4 µL de água ultra pura. A amplificação do gene foi realizada em aparelho StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher, USA, USA) de acordo com as seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de amplificação, contendo 15 segundos a 95 °C de anelamento e 64 °C por 1 minuto. Os níveis de expressão de *MTAP* nas amostras foram normalizadas utilizando o gene *HPRT1* (HPRT1 Forward 5'-GACCAGTCAACAGGGGACAT-

3'); (HPRT1 reverse 5'-CTGCATTGTTTTGCCAGTGT-3'). Todos os primers foram sintetizados pela Sigma-Aldrich (USA). A normalização do gene de interesse foi calculada de acordo com a expressão $2^{-\Delta Ct}$. Todas as reações foram realizadas em três replicatas biológicas. Neste screening, foram selecionadas 2 das linhagens celulares para edição gênica e estudos posteriores.

4.9 Avaliação da expressão de MTAP pela técnica de western blot

A análise de western blotting foi realizada de acordo com estudo previamente descrito¹¹⁹. Brevemente, as células foram lisadas utilizando tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl; 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 1 mM de Na_3VO_4 ; 10 mM de NaF, 10 mM de pirofosfato de sódio e 1% de NP40) contendo coquetel de inibidores de protease (0,01 M EDTA; 1 mM de DTT; 1 mM de Leupeptina; 1 mM de PMSF e 0,1 μM de aprotinina). O lisado celular foi colocado em repouso no gelo por 1 hora e centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. A concentração de proteína total foi estimada através de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) utilizando o reagente de Bradford (Quick Start Bradford Protein Assay; Bio-Rad, USA). As proteínas totais foram separadas por gel de poliacrilamida a 12% contendo Dodecil sulfato de sódio (SDS) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, USA). As membranas foram incubadas com anticorpo primários, seguido pelo anticorpo secundário após bloqueio com 5% de leite desnatado. A imunodeteção foi realizada utilizando kit ECL (Amersham Biosciences, Sweden) no sistema de foto documentação Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare, USA) e posteriormente quantificadas utilizando o software Image J⁷. Os seguintes anticorpos foram utilizados: Anticorpo policlonal anti-MTAP (Proteintech, USA) diluído 1:800 e o anticorpo anti- β -actina (Cell Signaling, USA) diluído a 1:5000.

4.10 Silenciamento do gene *MTAP* pela técnica CRISPR/Cas9

Após caracterização do perfil de expressão de *MTAP* nas linhagens de glioma, a linhagem U251 foi então transfectada com *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) / *CRISPR associated protein 9* (Cas9) de acordo com o protocolo do fabricante.

Resumidamente, em uma placa de 6 poços, aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas contendo 500 μL de meio DMEM (Life Technologies, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, USA), à 37°C , 5% de CO_2 e 90% de umidade, até que atingissem entre 70-90 % de confluência. Para a solução A, foram inseridos de 1,5 μg do pool de DNA dos plasmídeos (sc-406223) (Strand 1: CACCGACTACACACACCTCTCTCCGTTT; Strand 2: CACCGTCAACTACCAGGCGAACATC; Strand 3: CACCGAAATACCATACCTTGCAAGG) e 1,5 μg do plasmídeo MTAP HDR (h) (sc-406223-HDR ou 3,0 μg do plasmídeo de controle (sc-418922) em 150 μL de meio de cultura opti-MEM. A solução B, continha 10 μL do reagente de transfecção UltraCruztm (Santa Cruz Biotechnology, USA) em 150 μL de meio de cultura opti-MEM. Posteriormente, as soluções A e B foram reunidas, vortexadas e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Imediatamente após este período, os 300 μL resultantes das soluções foram colocadas em cada poço contendo as células. Após 72 horas da incubação, o meio de cultura foi retirado e adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do antibiótico puromicina (Santa Cruz Biotechnology, USA # CAS 58-58-2) por sete dias. A cada três dias, o meio de cultura foi aspirado e novo meio seletivo foi então adicionado aos poços.

O sucesso da edição gênica foi confirmado por meio da detecção da proteína de fluorescência vermelha (RFP) em microscópio de fluorescência e por western blotting. As sequências alvo do *MTAP* CRISP/Cas9 foram analisadas por meio do software Artemis¹⁴¹ para verificação da região de inserção no gene *MTAP* (Figura 12). A linhagem celular estável para o gene nocaute *MTAP*, foi denominada U251MTAP^{-/-}, seu controle denominado U251EV, além da linhagem parental denominada U251WT (ANEXO E). Nova autenticação da linhagem por meio da avaliação do perfil de short tandem repeat (STR) do DNA foi realizada pelo Laboratório de Diagnóstico no Hospital Câncer de Barretos (São Paulo, Brasil). Após a confirmação do silenciamento a linhagem celular, assim como o clone controle foram utilizados nos ensaios subsequentes.

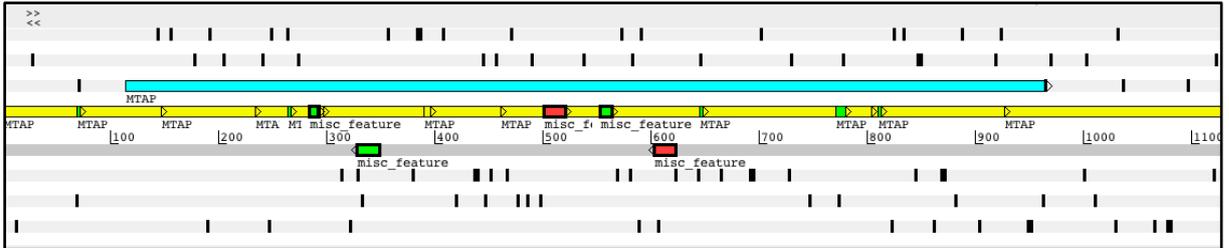


Figura 12 - Anotação da localização do gene *MTAP* no genoma humano, utilizando o software artemis genome browser and annotation tool. Barra vermelha: Indica região de anelamento dos primers forward e reverse para o gene *MTAP* utilizados na caracterização. Barra verde: seqüências alvo de atuação do *MTAP* CRISP/Cas9. Barra amarela: Segmento forward do genoma humano.

4.11 Transdução celular e geração de linhagem celular com expressão ectópica do gene *MTAP* pela técnica *Lentiviral Infection System*

A linhagem celular SW1088, que não expressa *MTAP*, foi utilizada para a expressão ectópica de *MTAP* (*MTAP* lentivirus Human, #LVP712487) e do controle lentiviral (*pLenti-iii-CMVGFP-2A-Puro-Blank control Lentiviral Vector*, #LV590) obtidas comercialmente da empresa Applied Biological Materials (abm Inc, Canada). A linhagem celular estável foi gerada transduzindo o gene *MTAP* ou o controle (sem inserto) e selecionado com 25 µg/mL de puromicina de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente, foi realizada a seleção da multiplicidade de infecção (MOI) com o controle de expressão de proteína de fluorescência verde (GFP) (LV006) para a linhagem celular SW1088 cultivada em placa de 96 poços (TPP®, Switzerland) em MOI de 2, 4, 6, 8 e 10 unidades.

O sucesso da expressão de GFP foi observada de acordo com o nível de fluorescência em microscópio de fluorescência (Leica, Wetzlar, Germany) após 48 horas. O MOI de 10 foi selecionado para os experimentos subsequentes que estavam com o nível de expressão adequados para quantidade celular com mínimo de dano celular. Foram plaqueadas 1×10^4 células em placa contendo 96 poços juntamente com 100 µL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB à 37°C e 5% de CO₂ até alcançar de 70-80% de confluência. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e adicionado novo meio contendo 150 µL da mistura para a transdução (*Viral Plus transduction enhancer* (G968) diluído 1:100 e vetor lentiviral *MTAP*

(#LVP712487) ou *Puro-Blank Lentivirus* (#LV590)) à 37 °C com 5% de CO² durante toda a noite. Após 72 horas do início da transdução, o meio de cultura foi retirado e adicionado novo meio de cultura, contendo 25µg/mL de puromicina e trocados a cada três dias. A seleção terminou após sete dias quando as células não transduzidas foram completamente mortas. A linhagem celular estável para o gene *MTAP*, foi denominada SW1088MTAP+/+ e seu controle denominada SW1088LB, além da linhagem parental denominada SW1088WT. A confirmação da expressão da proteína foi a confirmada por meio da técnica de western blot (ANEXO E).

Nova autenticação da linhagem por meio da avaliação do perfil de STR do DNA foi realizada pelo Laboratório de Diagnóstico no Hospital Câncer de Barretos (São Paulo, Brasil). Após a confirmação da superexpressão do gene *MTAP* na linhagem celular, ela e seu clone controle, foram utilizados nos ensaios subsequentes.

4.12 Avaliação de perfil de expressão gênica das linhagens editadas pela plataforma

NanoString

A análise de expressão gênica das linhagens celulares U251 e SW1088 após edição gênica (*MTAP*) foi realizada utilizando o painel *Nanostring nCounter PanCancer Pathways* (730 genes distribuídos em 13 vias biológicas: Notch, Wnt, Hedgehog, Modificação da cromatina, Regulação transcricional, Controle de dano ao DNA, TGF-beta, MAPK, STAT, PI3K, RAS, Ciclo celular e Apoptose) de acordo com as orientações do fabricante (Nanostring Technologies, USA). Os genes incluídos estão altamente associados à biologia do câncer e a vias normalmente desreguladas durante o desenvolvimento tumoral. Além disso, foram escolhidos 24 genes dentro do painel, frequentemente associados à agressividade tumoral e avaliada a expressão diferencial para melhor entendimento da função de *MTAP* nos processos de migração e invasão celular. Resumidamente, foi preparado um master mix contendo: 130 µL do buffer de hibridização em um microtubo contendo o pool de sonda repórter. Em seguida, foram adicionados em microtubos, 20 µl do master mix para cada amostra a ser analisada. Posteriormente, foram adicionados 5 µL da amostra (~100 ng) de RNA total, seguido de 5µL da sonda capture. A etapa de hibridização foi realizada durante aproximadamente 20h à 65 °C. Após a etapa de hibridização, as amostras foram transferidas para a plataforma de preparação e purificação dos cartuchos (PrepStation; nCounter Cartridge) durante 4h. Após a

purificação e imobilização das amostras, o cartucho foi então transferido para o analisador *Counter Digital Analyzer*, para a obtenção das imagens das amostras. A coleta de dados gera diversas imagens de alta resolução e conta as moléculas de acordo com o padrão de fluorescência determinado pelos barcodes na superfície dos cartuchos.

4.13 Ensaios funcionais de viabilidade, ciclo celular, proliferação, migração e invasão

4.13.1 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular em solução aquosa, *Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, USA) foi utilizado conforme descrito pelo fabricante. O CellTiter proliferation assay®, é um método colorimétrico para determinar o número de células viáveis nos ensaios de citotoxicidade. Possui o composto tetrazólio [3 - (4,5-dimetil-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio, sal interno; MTS] e um reagente de acoplamento de elétrons (fenazinaethosulfate; PES). PES possui uma estabilidade química melhorada, o que lhe permite ser combinado com MTS para formar uma solução estável colorida. Ao medir a absorvância das diferentes amostras testes e controle, pode-se inferir se o número de células vivas em cada amostra é semelhante. Para este ensaio, 5×10^3 células foram semeadas em placas de 96 poços em triplicatas e incubadas à 37 °C suplementadas com CO₂ por 24 horas. Após 24 horas, o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S foi retirado e então adicionado novo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, sem presença de P/S, contendo os fármacos de escolha em concentrações variadas (diluído em DMSO). As diluições dos compostos foram realizadas obedecendo à regra de 1% de DMSO/poço. A absorvância foi medida em leitor de placa de ELISA (Varioskan Flash-; Thermo Fisher scientific, USA) a 490 nm depois de decorrido 72 horas de tratamento. Os dados obtidos foram normalizados em relação à sobrevivência média das amostras sem tratamento (considerado 100% de viabilidade). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica. Nível de significância: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ e ns: não significante.

4.13.2 Determinação da IC50

O IC50 é um ensaio de dose-resposta onde se avalia a concentração mínima de um fármaco necessário para induzir inibição do crescimento em 50% das amostras. Após a avaliação por meio do ensaio com MTS, os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular no qual as células em presença do veículo (DMSO) foram utilizadas como controle, correspondendo a 100% de sobrevivência. A análise da regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism versão para Windows 7.04 (GraphPad Software, Inc, USA) foi utilizada para avaliar os resultados de viabilidade, resultando em uma equação utilizada para calcular a concentração do fármaco necessário para promover 50% de redução da viabilidade celular.

4.13.3 Análise da distribuição das fases do ciclo celular

A proliferação celular é um processo bastante coordenado onde as fases do ciclo celular (G1, S, G2, M) são reguladas de modo muito preciso por uma rede bioquímica complexa, controlando o processo de multiplicação celular. Para avaliar o ciclo celular das células editadas e compará-las com o da linhagem controle, foi utilizado o kit BD Cycletest Plus DNA (BD Biosciences, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, foram plaqueadas 5×10^5 células em placa de 6 poços até atingir entre 70 e 80% de confluência. Após atingir a confluência as células foram tratadas com DMSO ou IC50 dos fármacos de escolha por 72 horas. As amostras foram então lavadas com DPBS e em seguida desagregadas com accutase por 5 minutos à 37°C. Após esta etapa, as células foram ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e centrifugadas por 5 minutos a 1200xg. O meio de cultura foi então removido e 250 µL da solução tampão foram adicionados aos tubos e as células ressuspensas e centrifugadas novamente por 5 minutos a 1200xg. Finalmente, o sobrenadante foi aspirado, permanecendo aproximadamente 50 µL residuais para não interferir no centrifugado celular. Em um tubo, foram adicionadas aproximadamente 1×10^6 células/mL sendo então centrifugadas por 5 minutos à 1200xg e adicionados 250 µL da solução A em cada tubo e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução B em cada tudo e a solução agitada novamente. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, 200 µL da solução C (solução de marcação

iodeto de propídeo; PI) foram adicionados em cada tubo e incubados por 10 minutos em ambiente escuro a temperatura de 10 °C. As amostras foram então lidas no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 e analisadas no software de análise BD CSampler™ (BD Biosciences, USA).

4.13.4 Proliferação celular por monitoramento em tempo real com equipamento

xCELLigence

As linhagens celulares U251 MTAP^{-/-} e SW1088 MTAP^{+/+} foram monitoradas em tempo real com o equipamento *xCELLigence analyzer* (Roche Applied Science, USA) a fim de avaliar o perfil de proliferação comparando-os com as linhagens controle U251EV e SW1088LB, assim como as linhagens parentais U251WT e SW1088WT. O valor de impedância é medido pelo sistema RTCA DP e reportado como cell index. Foram plaqueadas entre 5×10^3 e 1×10^4 células em microplaca contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S. Após o plaqueamento, a microplaca foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos até que todas as células se sedimentassem no fundo do poço. Posteriormente, o equipamento xCELLigence foi normalizado com microplaca controle, a fim de retirar possíveis alterações nos microeletrodos. Por fim, a microplaca contendo as células foi colocada no equipamento, sendo o mesmo mantido dentro de estufa à 37°C e 5% de CO₂. O início da coleta dos dados foi iniciado após 4 horas de incubação para garantir a fixação das células na microplaca e então mantido por 72 horas, sendo coletadas as informações de proliferação automaticamente a cada hora. Após o fim do experimento, os dados foram analisados em software (ACEA Biosciences, USA) e analisada a proliferação por meio do cell index de cada linhagem celular. Para este experimento, foram realizadas três análises biológicas distintas.

4.13.5 Ensaio de migração celular

A propriedade de migração das linhagens celulares editadas geneticamente U251MTAP^{-/-} e SW1088MTAP^{+/+} além de seus controles foi analisada em ensaios de suporte celular permeável do tipo *Transwell* (Corning, Chelmsford St. Lowell, MA, USA) em insertos com membrana contendo poros de 8 µM de diâmetro, sem ou após tratamento com os fármacos de escolha (IC₅₀). O método de Transwell foi realizado adicionando entre 5×10^4 e 10×10^4

células diluídas em 500 μ L de meio DMEM, sem presença de SFB, sobre os insertos permitindo a migração das células através da membrana até o outro lado da superfície contendo meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Os insertos foram incubados a 37°C por 24 horas e posteriormente as membranas foram então lavadas com DPBS por 2 minutos, seguidos de fixação em metanol 100% por 3 minutos. Nesta etapa, o excesso de células na superfície foi removido com haste de algodão e, em seguida, as membranas foram coradas em hematoxilina (3 minutos) e eosina (3 minutos). Por fim, as membranas foram retiradas do inserto e montadas sobre lâmina contendo glicerina onde foram em seguida fotografadas por microscopia. O número de células migradas em cada membrana foi obtida a partir de dez campos diferentes, analisados por software de contagem de colônias OpenCFU.¹⁴² A média de valores de migração foram obtidos a partir de três experimentos biológicos e submetidos a teste t de student.

4.13.6 Ensaio de invasão celular

A propriedade de invasão das linhagens celulares editadas geneticamente U251MTAP^{-/-} e SW1088MTAP^{+/+}, assim como de seus controles foi analisada em ensaios de suporte celular permeável do tipo *Transwell* (Corning, Chelmsford St. Lowell, MA, USA) em insertos com membrana contendo matrigel, sem ou após tratamento com os fármacos de escolha seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente, os insertos contendo matrigel foram diluídos em 100 μ L meio de cultura DMEM sem SFB e incubados a 37°C em câmara suplementada com 5% de CO₂, por 1 hora. Após a lavagem e descolamento das células através de tripsina, elas foram ressuspensas em meio DMEM contendo 0,5% de SFB e contadas em aparelho de contagem celular *Countess II* (Thermo Fisher®, USA). Posteriormente as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1200 xg o meio de cultura foi removido, e então 2×10^5 células foram ressuspensas em 500 μ L de DMEM sem suplementação e inseridos dentro dos insertos contendo o matrigel. Na parte inferior do poço, foram adicionados 750 μ L de DMEM suplementado com 10% de SFB, permitindo o estímulo para a invasão celular através da membrana de matrigel. Os insertos foram incubados a 37°C por 24 horas e, após este período, os insertos foram lavados com DPBS por 2 minutos, seguidos de fixação em metanol 100% por 3 minutos. Nesta etapa, o excesso de células na superfície foi removido com haste de algodão e, em seguida, os insertos foram corados em hematoxilina (3 minutos) e eosina (3 minutos).

Por fim, as membranas foram retiradas do inserto e montadas sobre lâmina contendo glicerina onde foram fotografadas por microscopia. O número de células que invadiram cada membrana foi obtida a partir de dez campos diferentes, analisados por software de contagem de colônias OpenCFU¹⁴². A média de valores de invasão foram obtidos a partir de três experimentos biológicos e submetidos a teste t de student.

4.13.7 Exposição das células transfectadas à agentes farmacológicos

As células editadas geneticamente (U251MTAP^{-/-} e SW1088MTAP^{+/+}) assim como os controles (U251EV e SW1088LB) e as linhagens parentais (U251WT e SW1088WT) foram tratadas com o inibidor de síntese de purinas 6-tioguanina, que atua de forma a mimetizar nucleotídeos que serão incorporados ao DNA, gerando falha no processo de síntese de DNA e consequentemente iniciando parada do ciclo.

Além disso, as células foram tratadas com o fármaco padrão para o tratamento de glioblastoma (temozolamida), na concentração equivalente ao IC₅₀ definido. Em seguida, as linhagens foram novamente submetidas aos ensaios funcionais e os efeitos dos fármacos analisados.

4.14 Análise estatística

O levantamento dos dados clínico-patológicos de interesse foi realizado por meio de ficha individual padronizada (ANEXO A). Para registro e arquivo das informações, bem como o posterior processamento estatístico, foi criado um banco de dados específico em software SPSS¹⁴³, com os dados clínico-patológicos, moleculares e imuno-histoquímicos. Para testar a associação entre a frequência de alterações moleculares (genéticas e imuno-histoquímicas) e os diferentes grupos de tumores em estudo, foi utilizado o teste de χ^2 ou teste exato de Fisher. As curvas de sobrevida global e livre de doença foram estimados usando o método de Kaplan-Meier, e a significância determinada pelo teste de log-rank. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar as variações de expressão proteica entre os grupos de estudo. Resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$, com nível de significância igual: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ e ns: não significativa. As análises estatísticas foram realizadas nos programas SPSS para Windows¹⁴³ e as análises gráficas foram realizados

utilizando o software *GraphPad PRISM*¹⁴⁴ Os experimentos de Western blot foram avaliados semi-quantitativamente e avaliados por teste t de student. No experimento de proliferação celular, a curva de crescimento celular foi gerada automaticamente, de acordo com o *software xCELLigence RTCA systems* e os dados brutos utilizados em software gráfico¹⁴⁵ No experimento de migração, foram contados os números absolutos de células que transpassaram a membrana sendo contadas por meio de software de contagem OpenCFU¹⁴² e gerado gráficos em *software Prism GraphPad PRISM*.¹⁴⁴ Os ensaios *in vitro* realizados em triplicata e os resultados foram expressos por média, \pm desvio padrão, analisados de forma independentes por t-student ou ANOVA. Diferenças com valores de p-value: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ e ****: $p < 0,0001$ foram considerados como uma diferença significativa.

4.15 Aspectos éticos

Este projeto utiliza-se de linhagens celulares utilizadas anteriormente em projetos previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP). O projeto intitulado: “Estabelecimento, caracterização molecular e estudo de resposta terapêutica de culturas celulares primárias de tumores cerebrais” recebeu aprovação do CEP sob o número: (491/2011) para a utilização das linhagens tumorais primárias já estabelecidas no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos e para o uso de linhagens comerciais de gliomas possui a aprovação: (726/2013), o qual é intitulado: “Caracterização da atividade anti-neoplásica de compostos derivados da planta *Euphorbia tirucalli* em linhagens de tumores humanos”. Além disso, este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos-Fundação Pio XII- Barretos/SP sob o número: HCB/1175879, projeto depositado no CEP sob número 961/2015 (Anexo B).

5 RESULTADOS

5.1 Análise *in silico* das alterações moleculares de *MTAP* e seu impacto clínico

Através de análise *in silico* de 350 amostras de glioblastoma do TCGA (TCGA-GBM), foi avaliado a expressão do gene *MTAP* de acordo com alteração do número de cópias (CNA), assim como o status de metilação do locus gênico. Como observado na figura 13A, a expressão do gene *MTAP* foi significativamente menor no grupo com deleção homozigótica quando comparado ao grupo com ploidia normal ($p < 0,01$). A regulação de *MTAP* pode ser também afetada por mecanismos epigenéticos¹⁰⁴, por isso, foi avaliada a associação entre a expressão de *MTAP* e o status de metilação em 283 amostras. A metilação do gene *MTAP* foi encontrada em 21,2% dos casos (60/283). Entretanto, não foi observado associação entre o status de metilação e os níveis de expressão de *MTAP* em glioblastoma, como observado na figura (13B; $p = 0,633$).

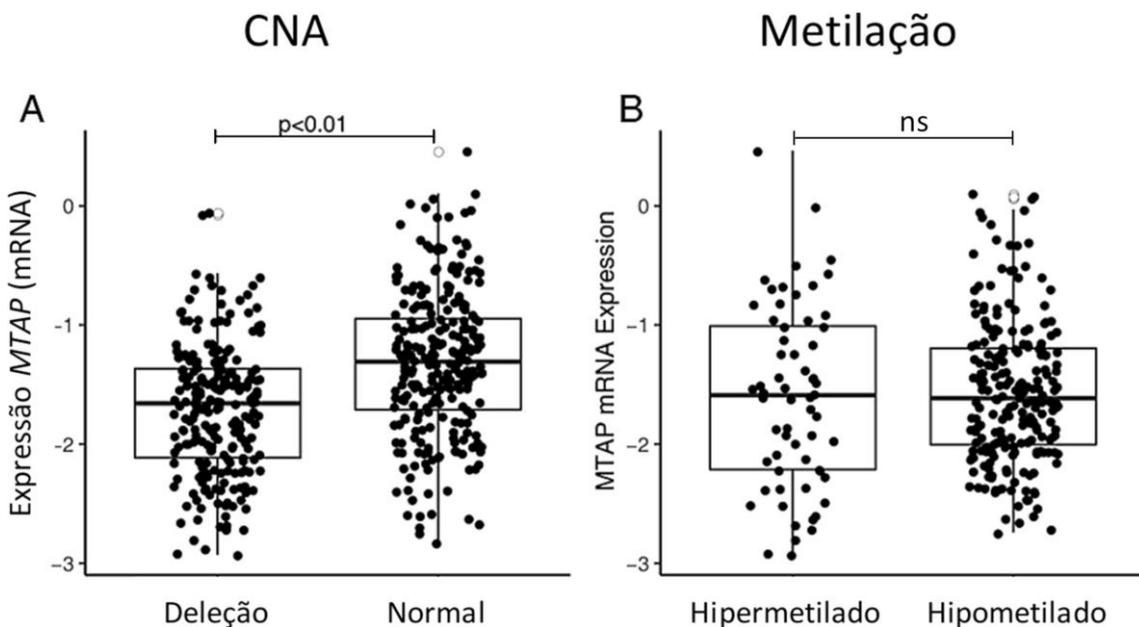


Figura 13 - Avaliação da expressão gênica de *MTAP* em tumores de pacientes com diagnóstico de glioblastoma, obtidos na base de dados TCGA-GBM. A) Box-plot representativo da análise de expressão de *MTAP* em grupo de pacientes com deleção da região cromossômica 9p21 comparado ao grupo de pacientes com a região cromossômica normal ($p < 0,01$). Valores de expressão (eixo y) nas categorias considerando a ploidia do paciente (aCGH, eixo x); B) Box-

plot representativo do status de metilação da região de *MTAP* de pacientes com diagnóstico de glioblastoma. Valores de expressão (eixo y) nas categorias considerando o perfil de metilação do paciente (eixo x). ns: p-value não significativo.

Adicionalmente, foram avaliados os níveis de expressão de *MTAP* (mRNA) de 291 amostras em cinco subtipos moleculares de glioblastoma obtidos da série TCGA-GBM. Foi observado que a perda de expressão de *MTAP* foi maior do que 50% em quase todos os subtipos analisados, exceto para o subtipo de gliomas com fenótipo metilador de ilhas CpG (G-CIMP) (Tabela 5). O subtipo clássico apresentou a maior frequência de perda de expressão de *MTAP* com 65,2% (43/66) contra 7,4% (2/25) para o subtipo G-CIMP ($p < 0,001$) (Tabela 6).

Tabela 5 - Expressão diferencial de *MTAP* nos subtipos moleculares de glioblastoma

| Subtipo | <i>MTAP</i> Positivo | <i>MTAP</i> Negativo | Total | <i>P</i> -value |
|-------------|----------------------|----------------------|-----------|-----------------|
| Clássico | 23 (34.8%) | 43 (65.2%) | 66 (100%) | < 0,001 |
| Mesenquimal | 36 (41.9%) | 50 (58.1%) | 86 (100%) | |
| Neural | 19 (37.3%) | 32 (62.7%) | 51 (100%) | |
| Proneural | 30 (49.2%) | 31 (50.8%) | 61 (100%) | |
| G-CIMP+ | 25 (92.6%) | 2 (7.4%) | 27 (100%) | |

Abreviação: G-CIMP+: *glioma-CpG island methylator phenotype*

Em seguida, correlacionou-se o perfil de expressão de *MTAP* com a sobrevida de pacientes em 6 bancos de dados obtidos da plataforma TCGA e Oncomine. Os resultados demonstraram que apenas o dataset Freije (n=19) apresentou associação significativa entre a expressão de *MTAP* e a sobrevida, aonde a expressão de *MTAP* indicou melhor desfecho clínico ($p=0,00863$). Nos demais datasets, não foi observado associação entre sobrevida e expressão de *MTAP* (Figura 14).

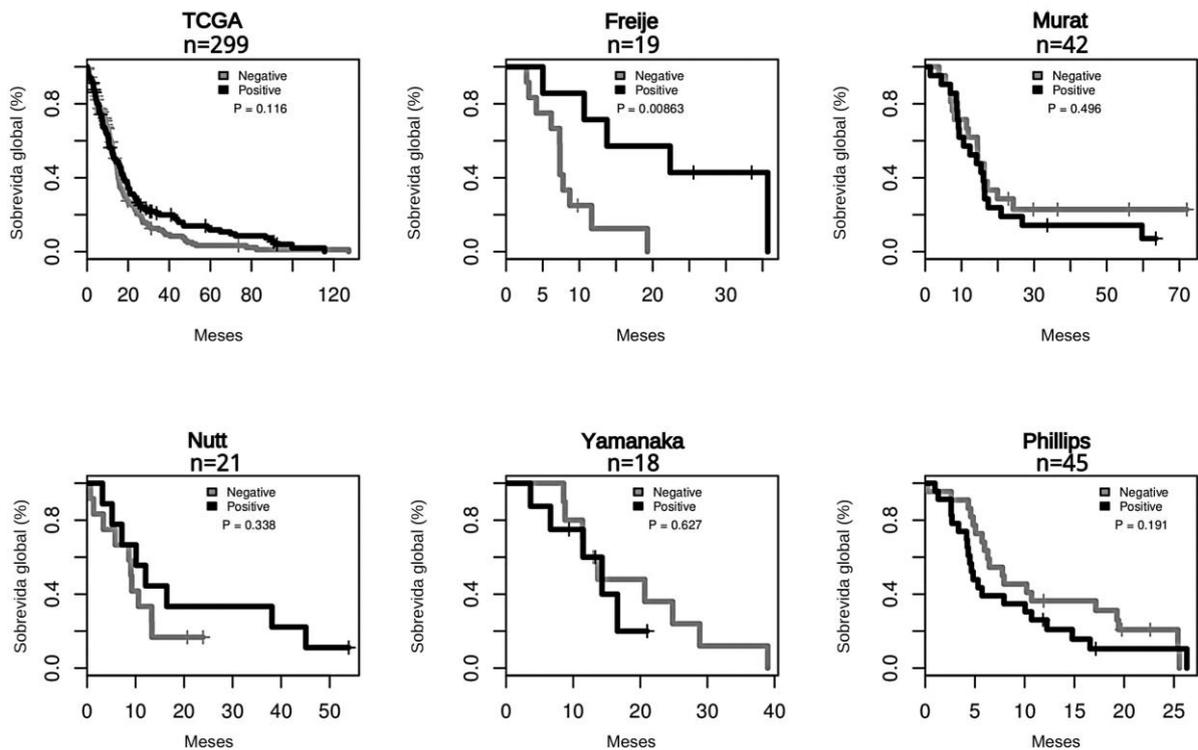


Figura 14 - Análise *in silico* avaliada pelo método de kaplan-meier para uma condição (expressão de *MTAP*) associada com a sobrevida global em diferentes coortes de pacientes com diagnóstico de glioblastoma. Coortes analisadas: TCGA, Freije, Murat, Nutt, Yamanaka e Phillips.

5.2 Avaliação da expressão de *MTAP* em pacientes com diagnóstico de glioma, por meio de imuno-histoquímica e correlação com dados moleculares e evolução clínica dos pacientes

A expressão de *MTAP* foi realizada por imuno-histoquímica em uma série de 641 amostras de pacientes de diferentes subtipos histológicos de gliomas (Tabela 6). De maneira global, encontramos perda de expressão da proteína *MTAP* em 44,15% (283/641) dos gliomas avaliados, com variações de frequência nos distintos graus e subtipos histológicos (Tabela 6; Figura 15A – 15D). A expressão de *MTAP* foi detectada em todos os tecidos normais adjacentes avaliados (Figura 15E). A perda de expressão de *MTAP* variou de 14,5% (10/69) no grupo de astrocitomas pilocíticos, 54,8% (23/42) em glioblastoma pediátrico, 45,6% (193/423) em glioblastoma adultos, e a maior perda verificamos no conjunto de oligodendrogliomas 62,7%

(32/51) (Tabela 6). Além disso, quando estratificamos em gliomas de baixo grau (grau I/II) e alto grau (III/IV), verificamos que a expressão de MTAP no grupo de baixo grau foi significativamente maior do que o observado no grupo de gliomas alto grau (Tabela 6). Não foi observada associação entre expressão de MTAP e as demais características clínico-patológicas como idade, gênero ou localização tumoral (Tabela 6).

Tabela 6 – Avaliação da expressão de MTAP em gliomas e associação com características clínico-patológicas dos pacientes.

| Características | Expressão de MTAP | | | | P value |
|--|-------------------|------|--------------|--------------|------------------|
| | Total | (%) | Negativo (%) | Positivo (%) | |
| Gênero (N=620) | | | | | |
| Masculino | 368 | 59,4 | 165 (44,8) | 203 (55,2) | 0,565 |
| Feminino | 252 | 40,6 | 107 (42,5) | 145 (57,5) | |
| Idade (N=638) | | | | | |
| 0-19 anos | 125 | 19,6 | 44 (35,2) | 81 (64,8) | 0,091 |
| 20-59 anos | 307 | 47,9 | 140 (45,6) | 167 (54,4) | |
| >59 anos | 206 | 32,5 | 96 (46,6) | 110 (53,4) | |
| Localização tumoral (N=393) | | | | | |
| Lobo Frontal | 92 | 23,4 | 26 (28,3) | 66 (71,7) | 0,096 |
| Lobo Parietal | 43 | 10,9 | 10 (23,3) | 33 (76,7) | |
| Lobo Temporal | 71 | 18,1 | 30 (42,3) | 41 (57,7) | |
| Lobo Occipital | 12 | 3,1 | 5 (41,7) | 7 (58,3) | |
| Cerebelo | 41 | 10,4 | 9 (22,0) | 32 (78,0) | |
| Outro | 134 | 34,1 | 50 (37,3) | 84 (62,7) | |
| Subtipo histológico (N=641) | | | | | |
| Astrocitoma pilocítico (Grau I) * | 69 | 10,8 | 10 (14,5) | 59 (85,5) | <0,001 |
| Astrocitoma difuso (Grau II) | 18 | 2,8 | 5 (27,8) | 13 (72,2) | |
| Astrocitoma anaplásico (Grau III) | 24 | 3,7 | 12 (50,0) | 12 (50,0) | |
| Glioblastoma pediátrico (Grau IV) | 42 | 6,6 | 23 (54,8) | 19 (45,2) | |
| Glioblastoma adulto (Grau IV) | 423 | 66 | 193 (45,6) | 230 (54,4) | |
| Oligodendrogliomas (Grau II-III) | 51 | 7,9 | 32 (62,7) | 19 (37,3) | |
| Outros | 14 | 2,2 | 8 (57,1) | 6 (42,9) | |
| Grau histológico (N=641) | | | | | |
| Baixo grau | 96 | 15,0 | 23 (24,0) | 73 (76,0) | <0,001 |
| Alto grau | 545 | 85,0 | 260 (47,0) | 285 (52,0) | |

Grau I-IV: Grau histológico definido de acordo com os critérios da organização mundial de saúde (OMS)³⁵. * previamente publicado por Becker et al¹¹⁹

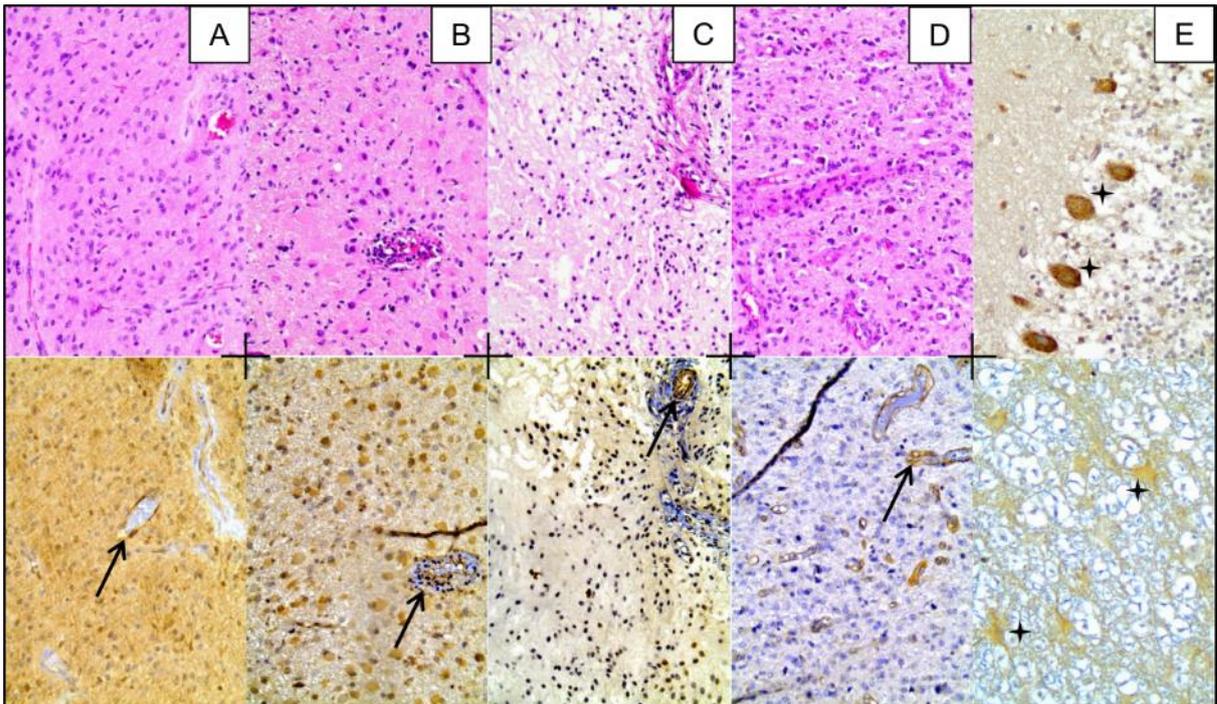


Figura 15 - Padrões de marcação da proteína MTAP por imuno-histoquímica em tecido cerebral de pacientes com diagnóstico de glioma. A) Corte histológico com marcação por hematoxilina/eosina (HE) e marcação forte por MTAP em amostra de astrocitoma pilocítico (400x). B) Corte histológico com marcação por hematoxilina/eosina (HE) e marcação moderada por MTAP em amostra de astrocitoma difuso (400x). C) Corte histológico com marcação por hematoxilina/eosina (HE) e marcação fraca por MTAP em amostra de astrocitoma anaplásico (400x). D) Corte histológico com marcação por hematoxilina/eosina (HE) e ausência de marcação por MTAP em amostra de glioblastoma (400x). E) Corte representativo de marcação de MTAP em cerebelo e medula espinhal de tecido cerebral normal (400x). Setas indicam vasos com forte marcação da proteína MTAP (controle interno positivo). Estrelas indicam células de purkinje e neurônios com marcação para a proteína MTAP.

Posteriormente, foi avaliado o efeito da expressão de MTAP na sobrevida global (Figura 16). Os resultados indicaram que a série contendo todos os casos de glioma (Global) apresentou sobrevida em dois anos de 26,5% para o grupo com ausência de expressão de MTAP e de 30,5% para o grupo com expressão de MTAP, entretanto, sem demonstrar diferença estatística significativa (Figura 16A; $p=0,748$).

Para o subgrupo de glioma de baixo grau, os pacientes com expressão de MTAP apresentaram uma melhor sobrevida do que aqueles com perda da expressão da proteína MTAP (Figura 16B; $p=0,0335$). Interessante notar que em relação aos subgrupos de glioma de alto grau e glioblastoma adulto, os dados apresentados indicaram uma melhor sobrevida para aqueles pacientes com a perda de expressão de MTAP (Figura 16C; $p=0,000595$ e Figura 16D; $p=0,00292$).

Especificadamente para os subgrupos: glioblastoma pediátrico e glioblastoma adulto, a análise de sobrevida não demonstrou diferença estatisticamente significativa para os pacientes pediátricos (Figura 16E; $p=0,199$). Já para os pacientes adultos, a análise de sobrevida indicou um melhor prognóstico para os pacientes com perda de expressão de MTAP, com uma diferença de sobrevida de aproximadamente 3 meses em dois anos, entre os 2 grupos (Figura 16F; $p=0,00135$).

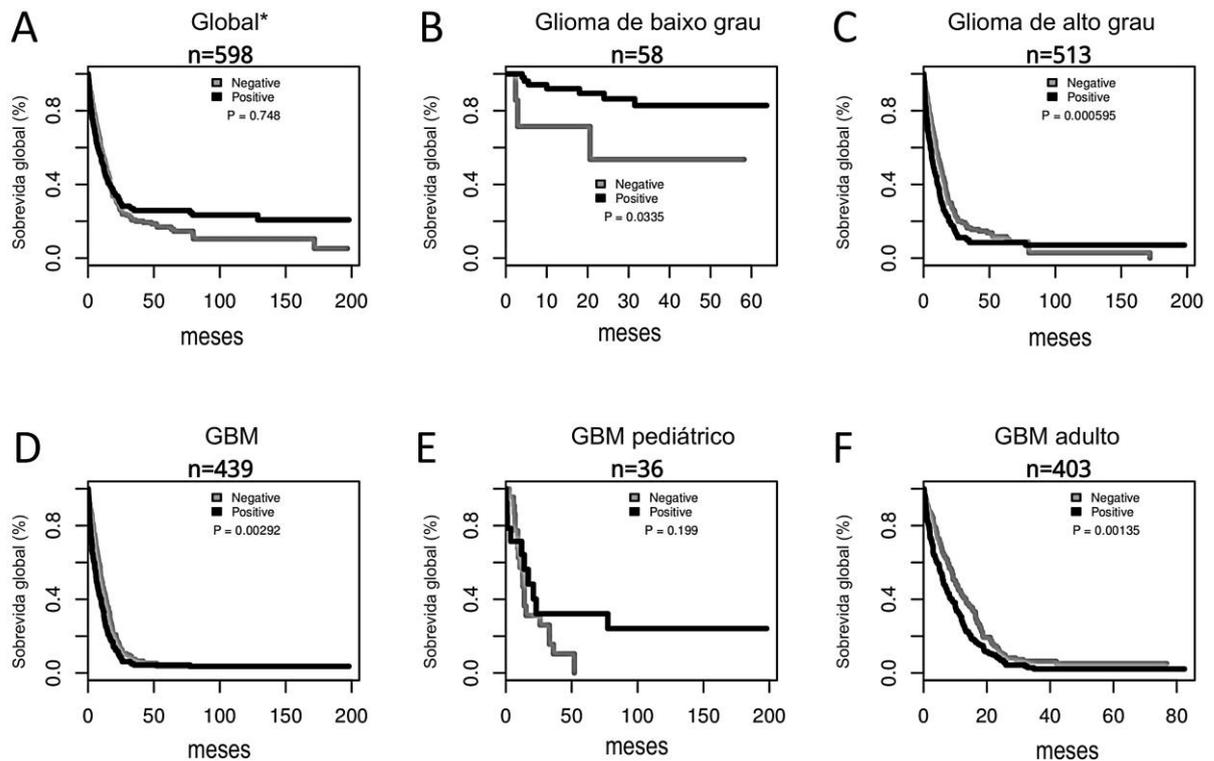


Figura 16 - Análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier para uma condição (expressão de MTAP) associado com a sobrevida global para série de pacientes com diagnóstico de glioma. Global*: Série de pacientes contendo todos os subtipos de glioma.

5.3 Caracterização do status de expressão de MTAP em painel de linhagens comerciais e primárias de glioma

Inicialmente, foi analisado o perfil mutacional das linhagens celulares de glioma utilizadas por meio de painel customizado contendo 21 genes, através da tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) (Anexo C), além do sequenciamento da região promotora de *TERT*, a avaliação da perda da região 9p21 (*CDKN2A*) e análise de expressão gênica e proteica de MTAP. (Figura 17, Anexo D).

De acordo com os resultados, nenhuma das linhagens celulares apresentaram mutação em *IDH1* ou *IDH2*. Os genes *ATRX* e *TP53* apresentaram mutação em 36,3% (4/11) e 80% (8/10) respectivamente. Em relação ao promotor do gene *TERT*, apenas as linhagens celulares pediátricas UW479 e SF188 (18,1% ;2/11) não apresentaram mutação. Além disso, todas as linhagens celulares originadas de tumores primários de crianças e adolescentes apresentaram a mutação no gene *SETD2*, enquanto sua frequência foi de 42,8% (3/7) nas linhagens celulares adultas.

Quando analisado a expressão de *MTAP* a nível mRNA e proteico, foi observada a perda em 36% (4/11) das linhagens celulares estabelecidas e em 28,6% (2/7) das linhagens celulares de origem primária (Figura 17A). É importante notar que apenas uma das linhagens pediátricas (UW479; 1/7), além de todas as linhagens pertencentes ao grupo de gliomas de baixo grau (RES259, HCB27 e HCB28), mantiveram a expressão de MTAP. Por fim, os resultados a nível gênico (mRNA), obtidos por RT-qPCR, evidenciam a correlação com os resultados proteicos (Figura 17B).

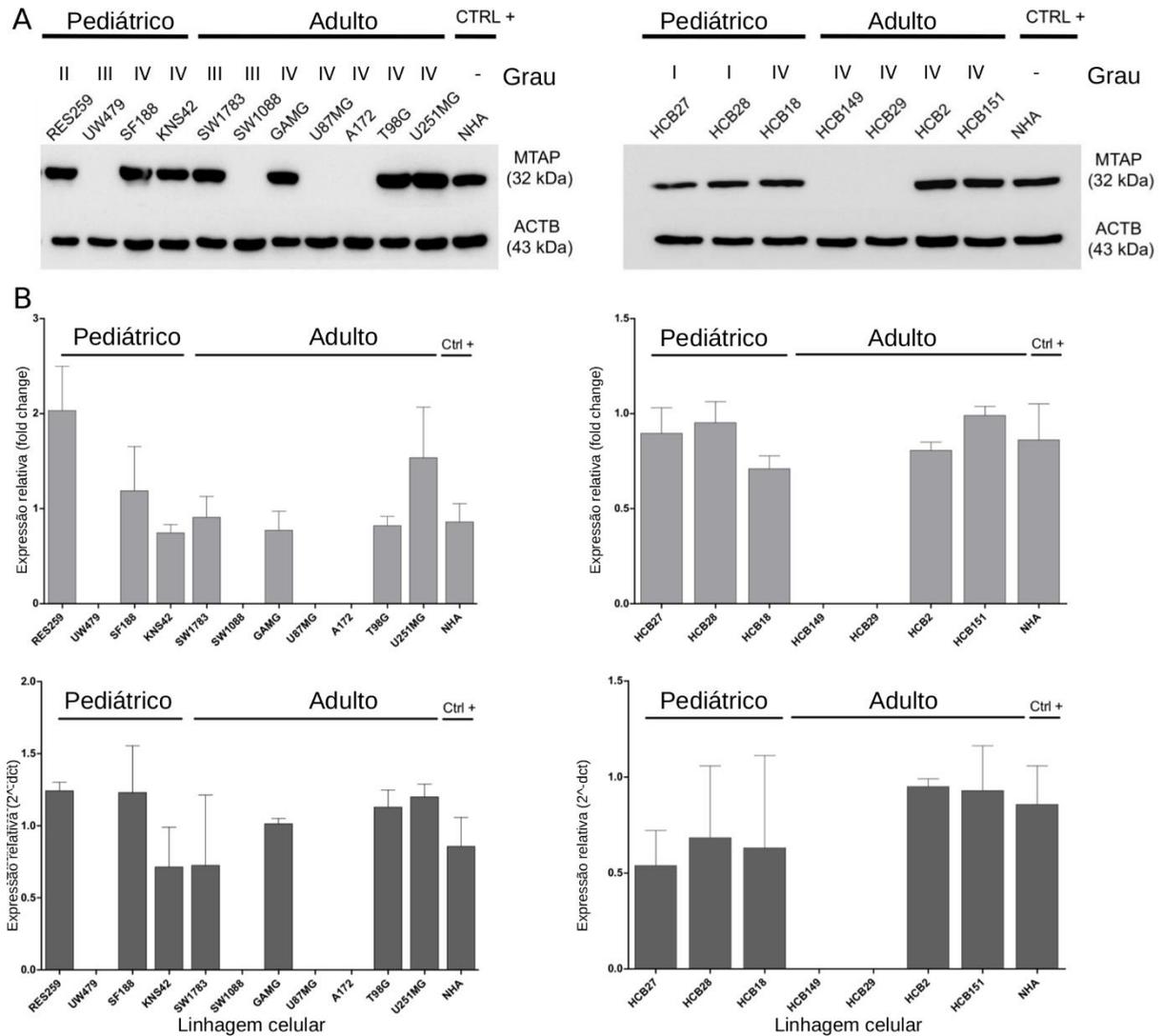


Figura 17 - Avaliação da expressão de MTAP em linhagens celulares de glioma. A). imunoblot representativo da expressão da proteína MTAP por western blot em linhagens celulares de glioma estabelecidas e de origem primária. B) Plot representativo da avaliação da expressão de MTAP por RT-qPCR e western blot no painel de linhagens de glioma. As amostras foram normalizadas pela proteína endógena ACTB (western blot) e pelo gene endógeno HPRT1 como controle endógeno. Abreviação: CTRL+: controle positivo

5.4 Silenciamento do gene *MTAP* pela técnica CRISPR System Transfection e Superexpressão do gene *MTAP* pela técnica Lentiviral Infection System

Com o objetivo de avaliar o papel biológico exercido pelo gene *MTAP* no contexto dos gliomas, foram selecionadas as linhagens comerciais U251MG (*MTAP* positivo), onde o

sistema de edição gênica MTAP CRISPR/Cas9 KO foi transfectado, produzindo um clone nocaute estável (U251MTAP^{-/-}). Por outro lado, a linhagem celular SW1088, com deleção de MTAP, foi selecionada para se estabelecer um clone estável por meio do sistema lentiviral MTAP humano. O estabelecimento dos clones foi confirmado pelo ensaio de western blotting após seleção com o fármaco puromicina, de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo E).

5.5 Avaliação de expressão gênica das linhagens editadas pela plataforma NanoString

Após a edição gênica, o perfil de transcrição gênica dos clones U251MTP^{-/-} e SW1088MTAP^{+/+}, assim como as linhagens controle (U251EV e SW1088LB) e as linhagens parentais (U251WT e SW1088WT) foram avaliados para análise de expressão gênica usando o painel *Nanostring PanCancer Pathways Panel* no qual foram analisados 13 vias biológicas frequentemente alteradas nos diversos tipos de tumores.

Dos 730 genes analisados, 17 genes diferencialmente expressos estavam associados a linhagem celular U251 e 6 genes à linhagem celular SW1088 (Figura18). Além disso, não foi observado nenhum gene diferencialmente expresso e comum entre ambas. Inicialmente, para a linhagem celular U251, foram encontrados 17 genes diferencialmente expressos em comparação com suas linhagens controle, sendo sete genes (*ANGPT1*, *NGFR*, *FN1*, *COL11A1*, *SPP1*, *RASGRF1*, e *MAPK10*) associados com as vias PI3K/RAS/MAPK, três genes (*TGFBR2*, *THBS1* e *BMP5*) associados com a via TGF- β , dois genes (*IDH2* e *ERBB2*) drivers e cinco (*TNFSF10*, *SFRP1*, *PLAT*, *NOTCH1* e *BRIP1*) associados a outras vias biológicas (Figura 18A, Anexo F). Ao se analisar apenas os genes diferencialmente expressos ($\text{Log}_2\text{FC} \pm 2$), foram observados seis genes com aumento de expressão (*ANGPT1*, *FN1*, *NGFR*, *RASGRF1*, *THBS1* e *TNFSF10*) e três genes com redução de expressão (*BMP5*, *COL11A1* e *MAPK10*) na linhagem com deleção de *MTAP* (Figura 18B).

Posteriormente, a mesma análise foi realizada com a linhagem editada SW1088. O clone SW1088MTAP^{+/+} apresentou alterações em seis genes (*IL6R*, *GPC4*, *IL13RA2*, *MAP2K6*, *E2F5* e *ETV1*), associados as vias JAK-STAT; PI3K; WNT, MAPK, regulação transcricional e Apoptose (Figura 18C, Anexo G). Seguindo com o ajuste do valor de p (p-valor ajustado $< 0,05$, $\text{Log}_2\text{FC} \geq 2$), somente GPC4 e IL13RA2 se apresentaram diferencialmente expressos quando comparado ao controle (Figura 18D, Anexo G). Por fim foi realizado a análise de conexões funcionais entre as proteínas codificadas pelos genes com alteração do nível de expressão para as linhagens U251

e SW1088 alteradas geneticamente. Para o clone U251MTAP^{-/-} 11 dos 17 genes apresentaram ao menos duas associações, como mostrado na figura 18. Estas associações foram principalmente centradas em cinco genes (*NOTCH1*, *ANGPT1*, *ERBB2*, *THBS1* e *FN1*) para o clone U251MTAP^{-/-} (Figura 18E). Por outro lado, para o clone SW1088MTAP^{+/+} somente os genes *IL6R* e *MAP2K6* demonstraram associação (Figura 18F).

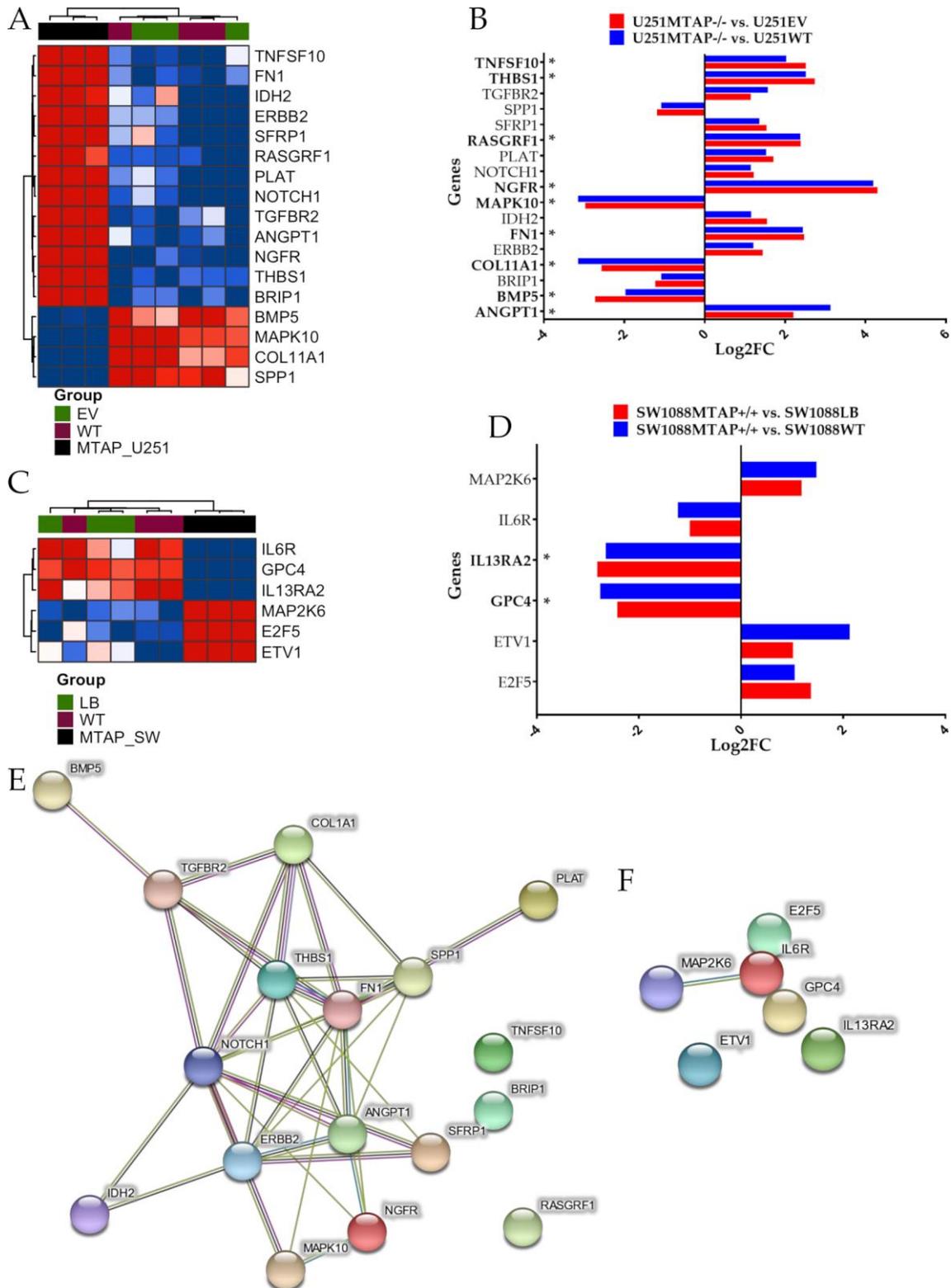


Figura 18 - Detecção dos genes diferencialmente expressos afetados pela edição do gene MTAP em linhagens de glioma. A) Heatmap representativo do perfil de expressão dos genes alterados para o clone U251MTAP^{-/-} comparado com os controles U251EV e U251WT. B) Gráfico de barras demonstrando os genes diferencialmente expressos com desvio padrão

(FC \pm 2) e fold-change para o clone U251MTAP $^{-/-}$ comparado aos controles U251EV e U251WT. C) Heatmap representativo dos genes com alteração nos níveis de expressão para o clone SW1088MTAP $+/+$ comparados aos clones SW1088LB e SW1088WT. D) Gráfico de barras com os genes diferencialmente expressos como média e desvio padrão e suas diferenças em fold-change para o clone SW1088MTAP $+/+$ em relação aos clones SW1088LB e SW1088WT. E-F) Vias de interação proteica transcritas pelos genes com alteração nos níveis de expressão das linhagens U251 e SW1088 editadas geneticamente utilizando o *software STRING* (<http://www.string-db.org>). A espessura das vias representa a confiança predita das interações. Rede de interação para os genes com alteração nos níveis de expressão para as linhagens U251MTAP $^{-/-}$ e SW1088MTAP $+/+$ comparadas aos controles U251EV/WT e SW1088LB/WT. Linhas representam os genes e as colunas representam as linhagens celulares. Coloração vermelha: representa aumento no nível de expressão. Coloração azul: representa redução nos níveis de expressão dos genes. A intensidade de cada coloração varia através de cada valor e a média de expressão de cada gene através de todas as amostras. Cada esfera representa uma proteína individual e cada linha de ligação representa as associações proteína-proteína. A linha vermelha indica a presença de evidencia de fusão, a linha verde indica evidência de proteínas vizinhas, a linha azul indica evidência de coocorrência, a linha roxa indica evidencia experimental, a linha amarela indica mineração de dados, a linha azul clara indica evidência de dados e a linha preta revela evidência de co-expressão. O asterisco (*) ao lado do gráfico de barras indicam diferença significativa (valor de $p < 0,05$ e $\log_2FC > 2$) entre a expressão gênica entre as linhagens celulares alteradas geneticamente e as linhagens celulares controles. Teste t de student: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, ns: não significante.

5.6 Avaliação da proliferação celular por monitoramento em tempo real

No intuito de avaliar o impacto funcional na proliferação celular, as linhagens U251MTAP $^{-/-}$, U251EV e U251WT assim como as linhagens celulares SW1088MTAP $+/+$, SW1088LB e SW1088WT, foram cultivadas, plaqueadas em cartucho de monitoramento E-plate e avaliados a taxa de proliferação (cell index) assim como o tempo de duplicação celular (Doubling time) (Figura 19). De acordo com os resultados, foi observado que a linhagem

celular U251MTAP^{-/-} apresentou características cinéticas similares aos clones U251EV (Figura 19A) e U251WT (Anexo H).

Quando analisado o tempo de duplicação celular (*doubling time*), foi observado que tanto em 24h ($3,32 \pm 0,88$ vs. $2,36 \pm 1,51$; $p=0,400$) quanto em 48h ($7,04 \pm 1,53$ vs. $5,32 \pm 3,38$; $p=0,800$) a linhagem U251MTAP^{-/-} apresentou uma taxa de crescimento menor em relação ao controle U251EV, entretanto, em 72h ($11,64 \pm 1,4$ vs. $10,36 \pm 1,64$; $p=0,547$). A taxa de proliferação celular apresentou um aumento do tempo de duplicação celular quando comparado ao clone U251EV sem, no entanto, apresentar diferença significativa (Figura 18B, 24h: $p>0,999$; 48h: $p>0,999$; 72h: $p=0,547$).

De forma semelhante, a linhagem celular SW1088MTAP^{+/+} não apresentou diferença entre as taxas de proliferação celular (Figura 19C; $p>0,05$) e tempo de duplicação (Figura 19D; 24h: $p=0,700$; 48h: $p=0,885$; 72h: $p=0,885$) comparado ao controle SW1088LB, assim como para o clone parental SW1088WT (Anexo H). Os resultados observados, sugerem que o gene *MTAP* não modula diretamente a proliferação celular.

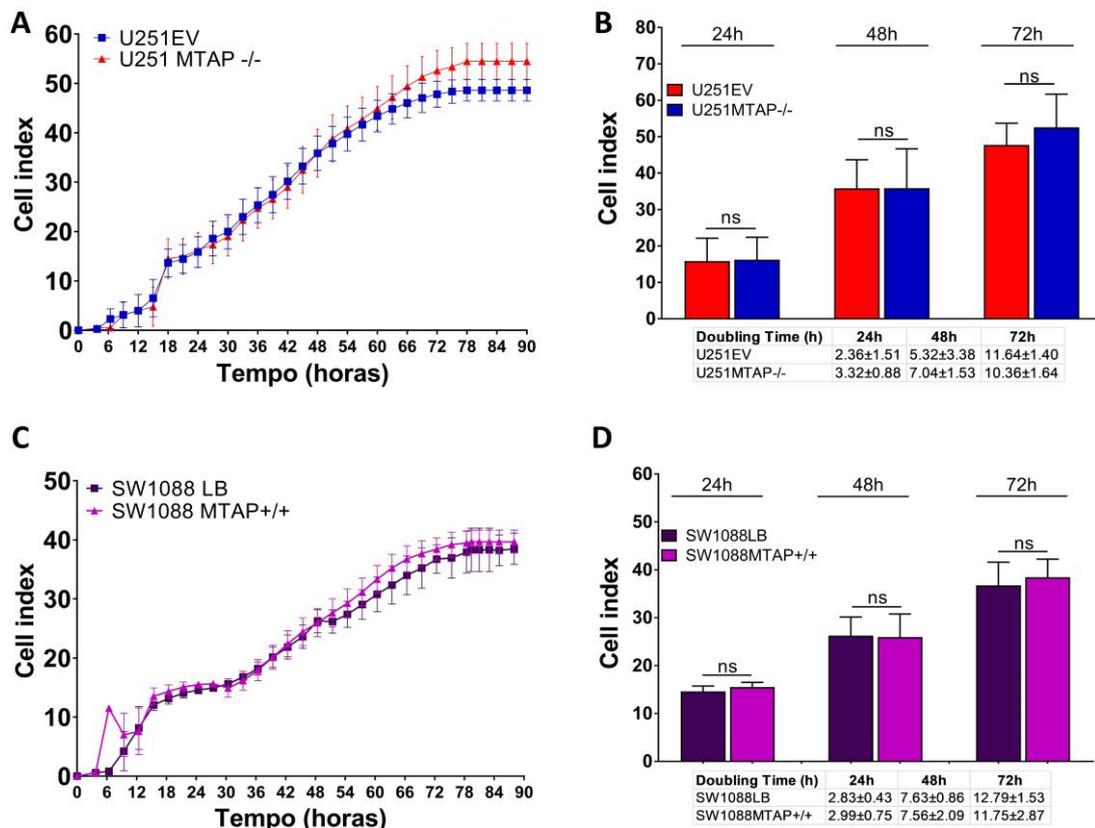


Figura 19 - Monitoramento dinâmico da proliferação celular utilizando a tecnologia de impedância. Os valores representativos de cell index para as linhagens celulares U251MTAP^{-/-}

/- vs. U251EV e SW1088MTAP+/+ vs. SW1088EV medido pelo aparelho de monitoramento em tempo real RTCA por 90 horas. Imagem representativa do cell index e tempo de duplicação celular entre 24 horas e 72 horas para as linhagens celulares U251MTAP-/- vs. U251EV e SW1088MTAP+/+ vs. SW1088LB. Os dados foram expressos como média e desvio padrão a partir de três experimentos independentes.

5.7 Ensaio de migração e invasão celular

Com o intuito de investigar se a deleção do gene *MTAP* poderia afetar a motilidade e a invasibilidade celular, foram realizados os ensaios de migração e invasão celular, utilizando membranas semipermeáveis. De acordo com os resultados, a perda do gene *MTAP* levou a linhagem celular U251MTAP-/- à redução da taxa de migração em aproximadamente 9% quando comparada a linhagem celular U251EV (U251MTAP-/-: $552 \pm 205,3$ vs. U251EV: $614,2 \pm 223$) (Figura 20A, $p=0,628$), enquanto a linhagem celular SW1088MTAP+/+ demonstrou um aumento de 19% em relação a linhagem celular SW1088LB (SW1088MTAP+/+: $687,6 \pm 138,1$ vs. SW1088LB: $557,8 \pm 40,8$) (Figura 20B; $p=0,400$).

Quanto ao potencial de invasão das linhagens editadas geneticamente, como mostrado na figura 20, a linhagem controle U251EV ($601,7 \pm 201,6$) exibiu aumento de apenas 8% na taxa de invasão quando comparado a linhagem U251MTAP-/- ($553,7 \pm 181,6$) (Figura 20C; $p=0,857$). Da mesma forma, a linhagem expressando o gene *MTAP* (SW1088MTAP+/+), apresentou uma frequência de aproximadamente 12% maior (SW1088MTAP+/+: $264,3 \pm 50,7$ vs. SW1088LB: $230,7 \pm 31,9$) comparado a linhagem SW1088LB (Figura 20D; $p=0,628$) Além disso, foram obtidos resultados similares quando comparados as linhagens celulares U251MTAP-/- vs. U251WT e SW1088MTAP+/+ vs. SW1088WT (Dados não apresentados).

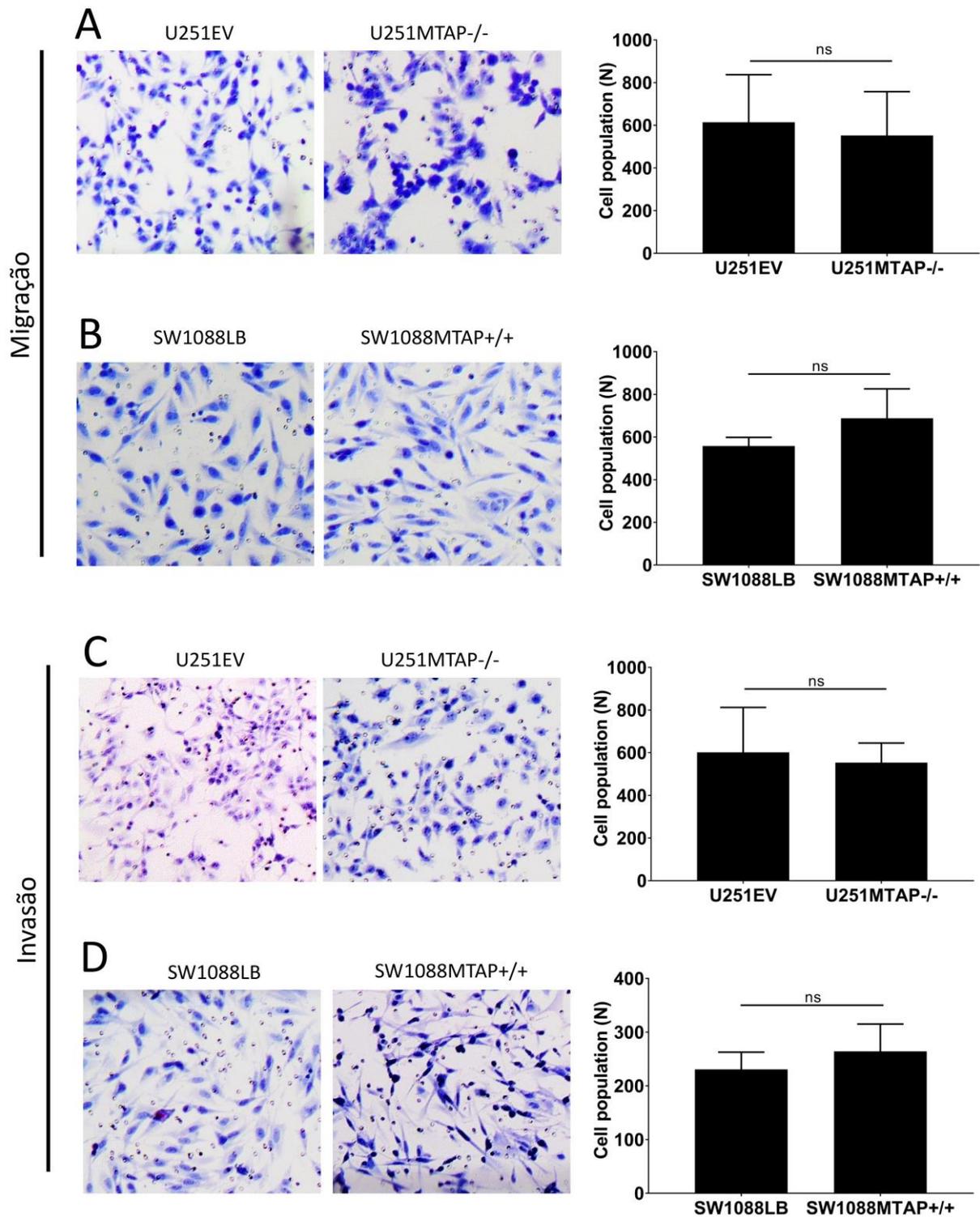


Figura 20 - Modulação dos processos de migração e invasão celular pelo gene *MTAP*. O potencial de migração em ambas as linhagens celulares U251MTAP^{-/-} (A) e SW1088MTAP^{+/+} (B) comparado aos respectivos controles (U251EV e SW1088LB) medido por ensaio *transwell* e expresso como população celular relativa. Ensaio de invasão transmembrana da linhagem celular U251MTAP^{-/-} (C) e SW1088MTAP^{+/+}(D) comparado aos respectivos controles

(U251EV e SW1088LB). A quantificação das células foi realizada por meio de contagem de no mínimo 10 campos em duas membranas separadas para cada experimento. Os gráficos representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes.

Posteriormente, com a finalidade de complementar os resultados *in vitro*, foram avaliados, dentre os 730 genes do painel de expressão gênica *Nanostring PanCancer*, 24 genes frequentemente associados aos processos de invasão e migração tumoral. De acordo com os resultados, somente 2 genes (*FN1* e *MAPK10*) se mostraram diferencialmente expressos para a linhagem celular U251MTAP^{-/-} comparada ao controle U251EV (Anexo I). O gene *FN1* apresentou aumento nos níveis de expressão ($\log_2FC=2,26$; $p=0,0006$) ao contrário do gene *MAPK10* que apresentou redução nos níveis de expressão ($\log_2FC=-3,28$; $p<0,0001$). Além disso, não foi observado alteração nos níveis de expressão entre a linhagem celular SW1088MTAP^{+/+} e a linhagem celular SW1088LB (Anexo I). Os resultados obtidos da caracterização do perfil de expressão de mRNA e proteína de MTAP e associação de sua expressão no desfecho clínico em uma série de pacientes com diagnóstico de glioma, além, da avaliação do papel biológico basal de MTAP em linhagens editadas geneticamente deu origem ao artigo intitulado “*Loss of 5'-Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) is Frequent in High-Grade Gliomas; Nevertheless, it is Not Associated with Higher Tumor Aggressiveness*”, publicado na revista Cells (Anexo J).

5.8 Estudo da viabilidade celular após edição gênica e exposição a fármacos inibidores de síntese *de novo* de purinas e a temozolamida

Foram avaliados os níveis de citotoxicidade dos fármacos 6-tioguanina (6TG) e temozolamida (TMZ), por meio de ensaio de viabilidade celular com identificação do IC50 para as linhagens celulares submetidas à edição gênica U251MTAP^{-/-} e SW1088MTAP^{+/+} na ausência e na presença da 5'-metiltioadenosina (MTA), substrato da enzima MTAP. Inicialmente, foram avaliados os níveis de citotoxicidade de MTA para os clones das linhagens celulares U251 (Figura 21A; U251WT, U251EV e U251MTAP^{-/-}) e SW1088 (Figura 21B; SW1088WT, SW1088LB e SW1088MTAP^{+/+}).

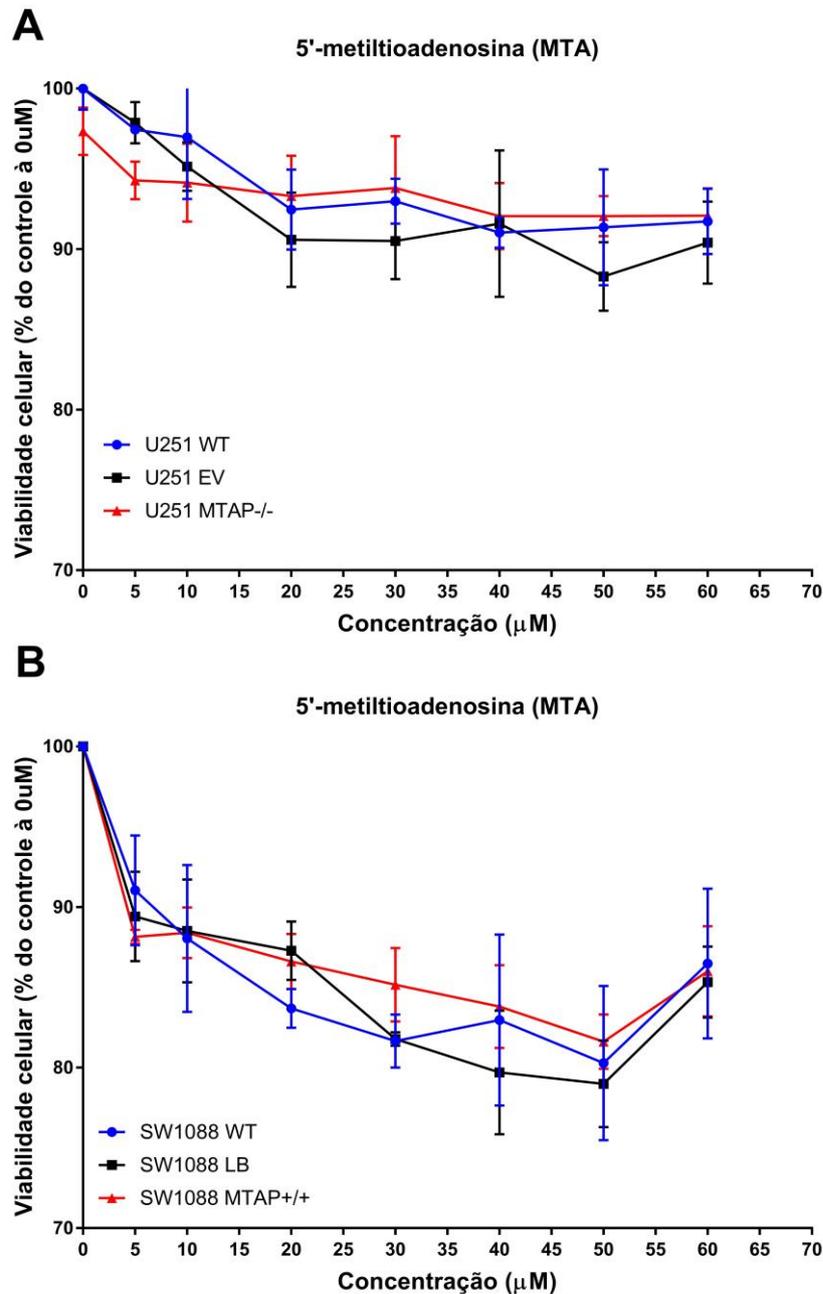


Figura 21 - Citotoxicidade do substrato 5'-metiltoadenosina (MTA) de acordo com a concentração. A) Viabilidade celular dos clones da linhagem U251 (U251MTAP^{-/-}, U251EV e U251WT) avaliada de acordo com os níveis de concentração de MTA após 72 horas de exposição. B) Viabilidade celular dos clones da linhagem U251 (SW1088MTAP^{+/+}, SW1088LB e SW1088WT) avaliada de acordo com os níveis de concentração de MTA após 72 horas de exposição. Os dados foram coletados a partir de 3 experimentos independentes em triplicata.

Para a linhagem U251, os resultados indicaram viabilidade celular acima de 95% para as concentrações de 5 e 10 μM e acima de 80% para as demais concentrações até o limite avaliado de 60 μM (Figura 21A). Em relação à linhagem celular SW1088, os clones avaliados, apresentaram viabilidade celular próximos a 90% para as concentrações de 5 e 10 μM , havendo uma redução para 80% de viabilidade celular até a concentração de 50 μM com posterior aumento da viabilidade para 90% em concentração de 60 μM (Figura 21B). Após a determinação da viabilidade celular, foi utilizada a concentração de 5 μM para os ensaios subsequentes.

Quando avaliado os níveis de citotoxicidade dos fármacos 6TG e TMZ isoladamente, estes apresentaram atividade citotóxica tanto à linhagem U251 quanto na linhagem celular SW1088, como podemos observar resumidamente nas figuras 22 e 23 e pela determinação de IC50 resumida na tabela 7. O efeito dos fármacos foi dose-dependente em todos os clones avaliados (Figura 22 e 23).

Tabela 7 - Concentração inibitória dos fármacos capaz de matar e ou inibir 50% das células tumorais de glioma U251 e SW1088.

| Fármaco | U251WT | U251WT (5 μM MTA) | U251EV | U251EV (5 μM MTA) | U251 MTAP-/- | U251 MTAP-/- (5 μM MTA) |
|-----------------------|--------|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------------|---------------------------------------|
| 6TG (μM) | 42,0 | > 60,0 | 48,2 | > 60,0 | 18,0 | 24,1 |
| TMZ (μM) | 737,0 | NA | 830,1 | NA | 200,7 | NA |

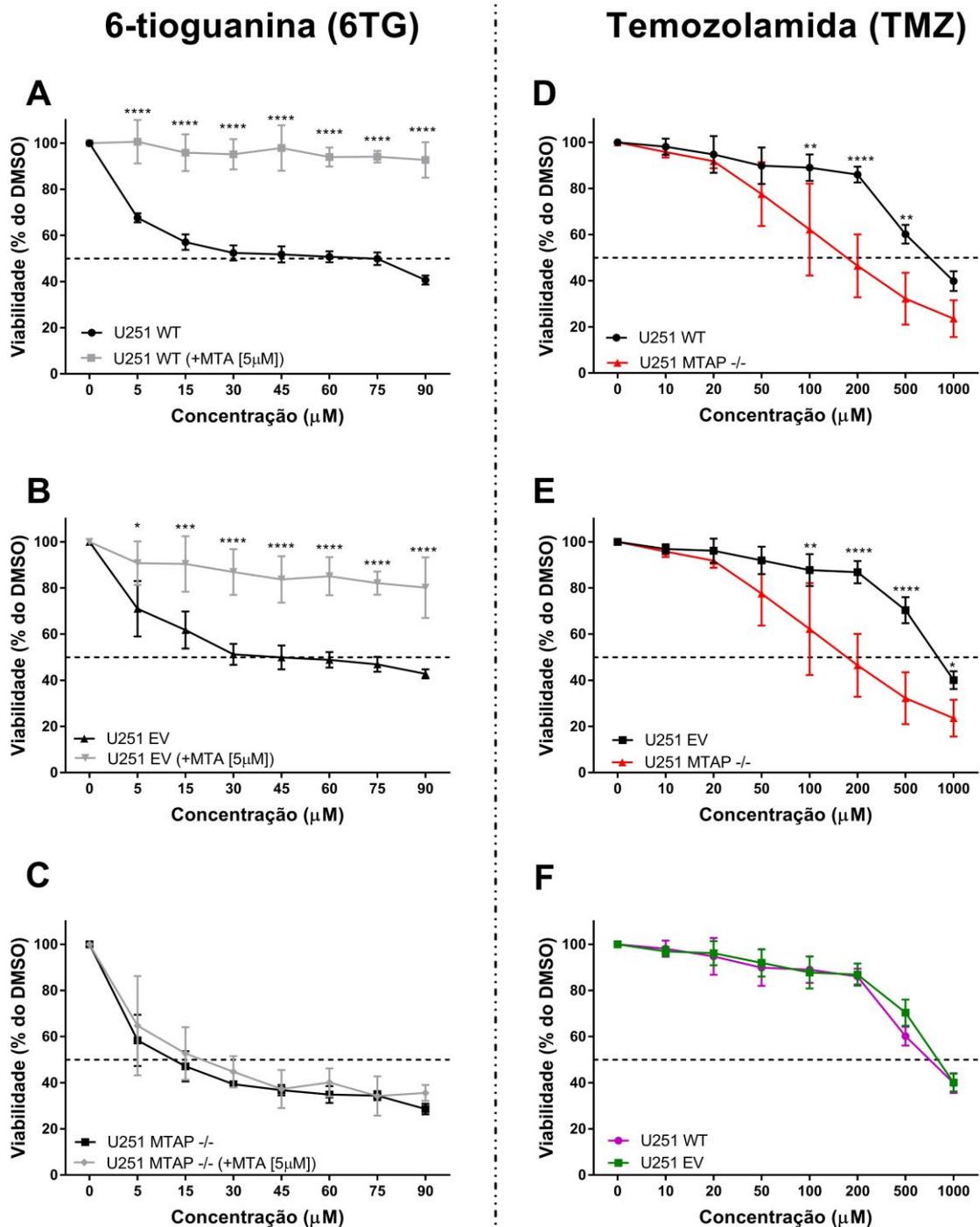
| Fármaco | SW1088 WT | SW1088 WT (5 μM MTA) | SW1088 LB | SW1088 LB (5 μM MTA) | SW1088 MTAP +/+ | SW1088 MTAP +/+ (5 μM MTA) |
|-----------------------|-----------|------------------------------------|-----------|------------------------------------|--------------------|--|
| 6TG (μM) | 625,9 | 591,3 | 670,2 | 692,7 | 598,9 | >700 |
| TMZ (μM) | 432,6 | NA | 418,7 | NA | 310,9 | NA |

NA: Não avaliado.

Os clones U251 WT (IC50= 42,0 μM) e U251EV (IC50= 48,2 μM) expostos com o fármaco 6TG, tiveram efeitos similares na viabilidade celular (Figura 22A e 22B) quando comparados ao clone silenciado U251 MTAP-/- (Figura 22C), que apresentou redução duas vezes maior. (Figura 22C; IC50=18,0 μM). Interessante notar que, após a adição do substrato (MTA), os clones U251WT e U251EV apresentaram IC50 acima da concentração limite estabelecida

(>90 μ M), enquanto a linhagem celular U251 MTAP^{-/-} demonstrou valor de IC₅₀ de 24,1 μ M, similar ao anteriormente avaliado sem o substrato (Figura 22C; Tabela7).

Relativamente ao fármaco TMZ, foi observado valores de IC₅₀ de 737 μ M e 830,1 μ M para as linhagens celulares U251WT (Figura 22D) e U251EV (Figura 22E), diferentemente ao observado para a linhagem celular U251MTAP^{-/-} onde o IC₅₀ observado foi de 200,7 μ M. Os resultados foram semelhantes aos observados com o fármaco 6TG, sugerindo uma maior sensibilidade da linhagem celular U251MTAP^{-/-} aos fármacos testados. Não houve diferença significativa entre os clones U251 WT e U251EV como observados na Figura 22 F ($p>0,999$).



F

Viabilidade (% do DMSO)

Concentração (μM)

■ U251 WT
■ U251 EV

Figura 22 - Viabilidade celular para os clones U251WT (A-D), U251EV (B-E) e U251MTAP-/- (C-F) de acordo com a concentração dos fármacos 6-tioguanina (6TG) e temozolamida (TMZ) combinado ou não com o substrato MTA. A viabilidade celular foi mensurada com o ensaio de MTS após 72 horas de tratamento com os fármacos. Os resultados foram expressos como a porcentagem média e desvio padrão de células viáveis relativamente ao DMSO (considerado 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. A exposição ao TMZ não foi suplementada com o

substrato MTA, devido à ação do fármaco atuar em outra via de ação biológica. Abreviatura: WT: Wild type; EV: Empty vector; MTAP -/-: Gene *MTAP* silenciado da expressão da proteína MTAP. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$, ns: não significante

Para a linhagem celular SW1088, O IC50 calculado para os clones controle, SW1088WT e SW1088LB os valores foram de 625,9 μM e 670,2 μM respectivamente (Figura 23A e 23B), em relação ao clone SW1088MTAP+/+ onde o valor de IC50 calculado foi de 598,9 μM (Figura 23C). Da mesma forma que avaliado para a linhagem U251, buscamos avaliar a atuação do substrato MTA na viabilidade celular mimetizando o efeito entre as células com deleção homozigótica do gene *MTAP* e as células normais e tratadas com o fármaco 6TG. Os resultados observados para o clone SW1088WT foi de 591,3 μM (Figura 23A) e para o clone SW1088LB foi de 692,7 μM (Figura 23B). Já para linhagem celular SW1088MTAP+/+ a presença de MTA levou o IC50 acima de 700 μM . (Figura 22C). O tratamento das linhagens celulares com o fármaco TMZ levou a diminuição da viabilidade para todos os clones avaliados, com IC50 de 432,6 μM (SW1088WT), 418,7 μM (SW1088LB) e 310,9 μM (SW1088MTAP+/+) (Figura 23 D-F; Tabela 7).

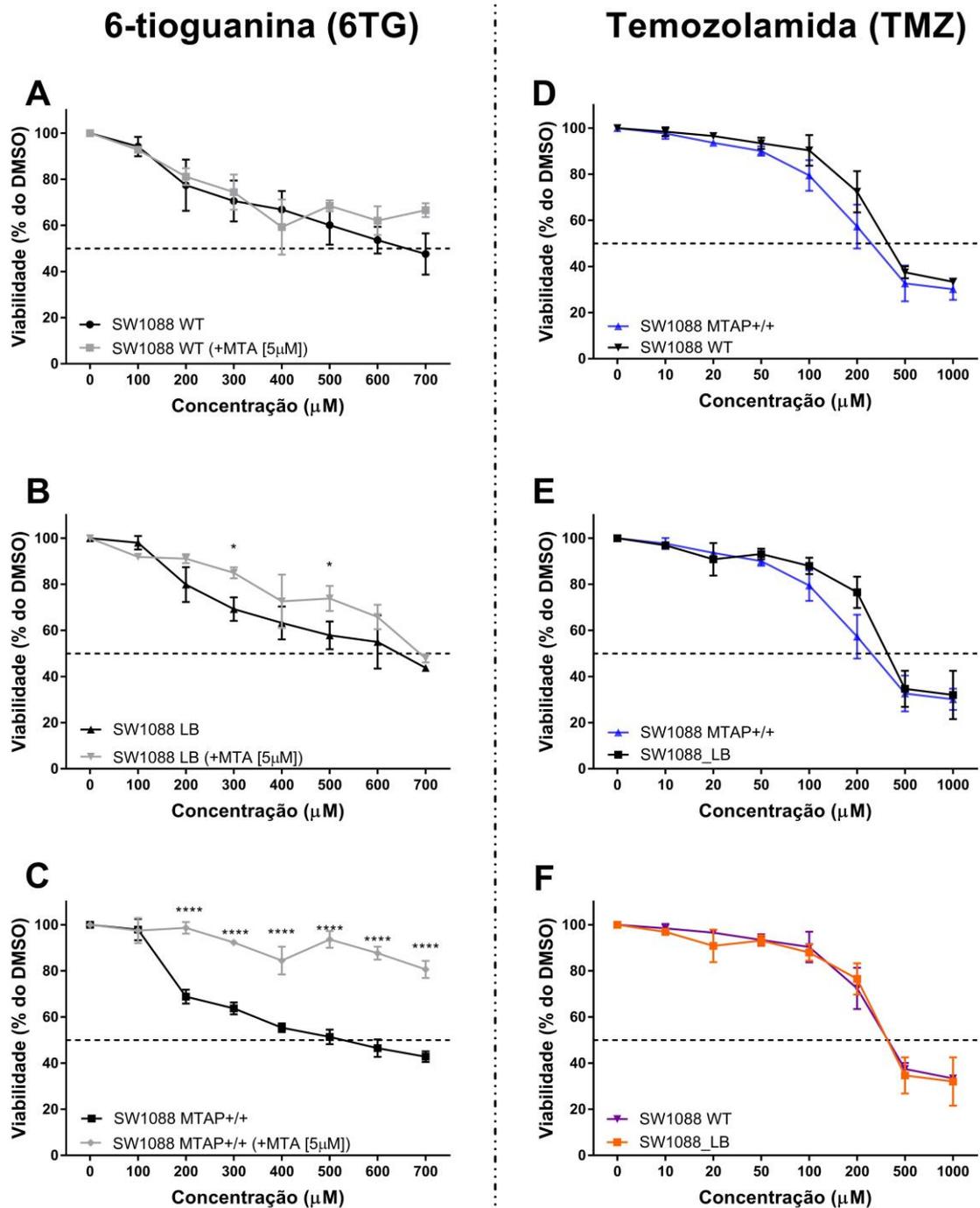


Figura 23 - Viabilidade celular para os clones SW1088WT (A-D), SW1088LB(B-E) e SW1088MTAP+/+(C-F) de acordo com a concentração dos fármacos 6-tioguanina (6TG) combinado ou não com o substrato MTA e temozolamida (TMZ). A viabilidade celular foi mensurada com o ensaio de MTS após 72 horas de tratamento com os fármacos. Os resultados foram expressos como a porcentagem média e desvio padrão de células viáveis relativamente ao DMSO (considerado 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. A exposição ao TMZ não foi

suplementada com o substrato MTA, devido a ação do fármaco atuar em outra via de ação biológica. Abreviatura: WT: Wild type; LB: Lentiblack; MTAP -/-: Gene *MTAP* silenciado da expressão da proteína MTAP. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$, ns: não significante

5.9 Análise do ciclo celular em linhagens celulares editadas geneticamente, expostas aos fármacos temozolamida e 6-tioguanina

Após a análise de viabilidade celular e determinação do IC50 dos fármacos, foi realizado o ensaio de citometria celular, buscando identificar alterações no ciclo celular dos clones editados geneticamente submetidos à exposição com os fármacos TMZ e 6TG (Figura 24 e Figura 25).

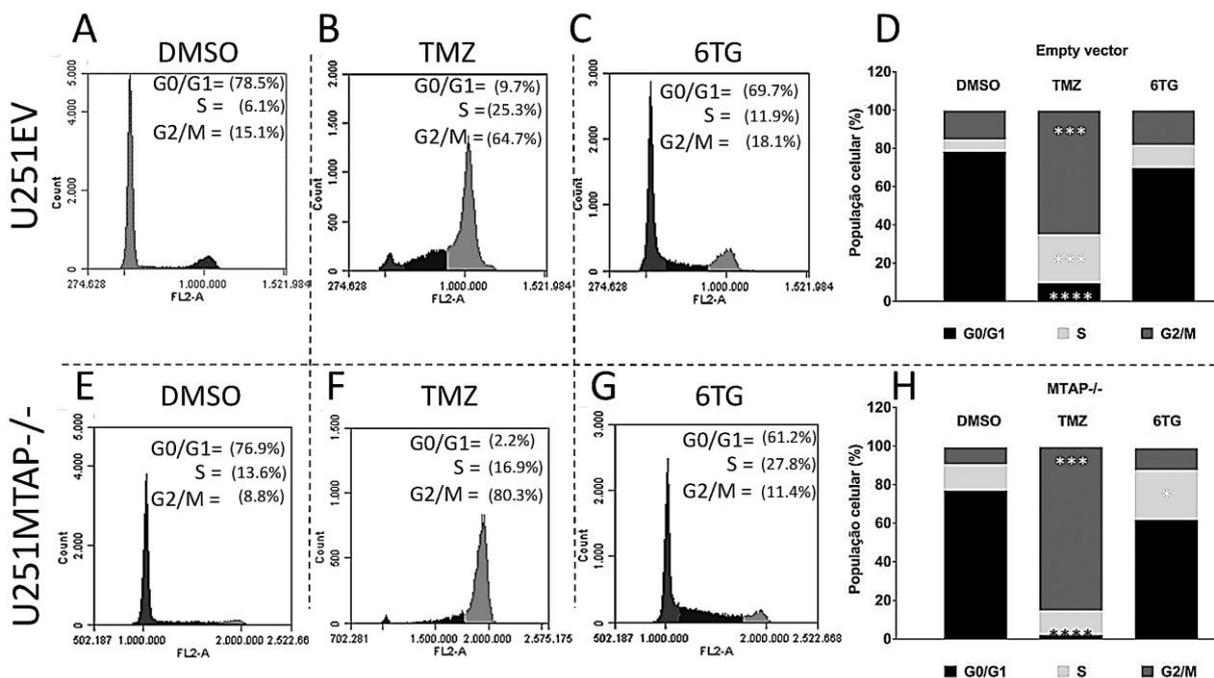


Figura 24 - Representação esquemática da análise do ciclo celular dos clones da linhagem celular U251 MTAP-/- e seu controle (U251EV), expostas aos fármacos 6-TG (IC50) e temozolamida (IC50) por 72 horas. Atividade do *cell sorter* com a análise da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular para os clones U251EV (A-C) e U251MTAP-/- (E-F). Gráfico de barras superpostas representativo do ciclo celular após exposição aos fármacos TMZ e 6TG,

além do veículo DMSO para os clones U251EV (D) e U251MTAP^{-/-} (H). Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

De forma geral, os resultados da análise de ciclo celular sugerem que a exposição à TMZ induziu arrasto nos clones U251EV (Figura 24B) e U251 MTAP^{-/-} (Figura 24 F), com redução da frequência celular na fase G0/G1 e aumento da frequência celular nas fases S e G2/M, sendo este efeito mais expressivo para o clone U251MTAP^{-/-}, quando comparados ao clone contendo DMSO (Figura 24A/D e Figura 24E/H). Inicialmente, para o clone U251EV, a exposição ao TMZ levou à alterações em todas as fases do ciclo celular observadas: G0/G1 (9,7% x 78,5%; $p = 0,0005$), S (25,3% x 6,1%; $p = 0,0003$) e G2/M (64,7% x 15,1%; $p < 0,0001$) (Figura 24B). Para o clone U251MTAP^{-/-} foi observado a redução da fase G0/G1 (2,2% X 76,9%; $p = 0,0023$) e aumento da fase G2/M (80,8% X 8,3%; $p < 0,0001$), entretanto não houve alterações significativas para a fase S.

Com relação ao fármaco 6TG, os resultados demonstraram que a exposição induziu o aumento da população celular na fase S para o clone U251MTAP^{-/-} (Figura 24G; fase S: $p = 0,0257$) em relação ao controle contendo DMSO. Quando comparados diretamente, os clones U251EV (Figura 24G) e U251MTAP^{-/-} (Figura 24E), após exposição à 6TG, observou-se o aumento da fase S para o clone U251 MTAP^{-/-} em relação ao clone U251 EV ($p = 0,0318$).

Posteriormente, os clones da linhagem SW1088 (SW1088LB e SW1088MTAP^{+/+}) foram avaliados após etapa de exposição aos fármacos TMZ e 6TG (Figura 25).

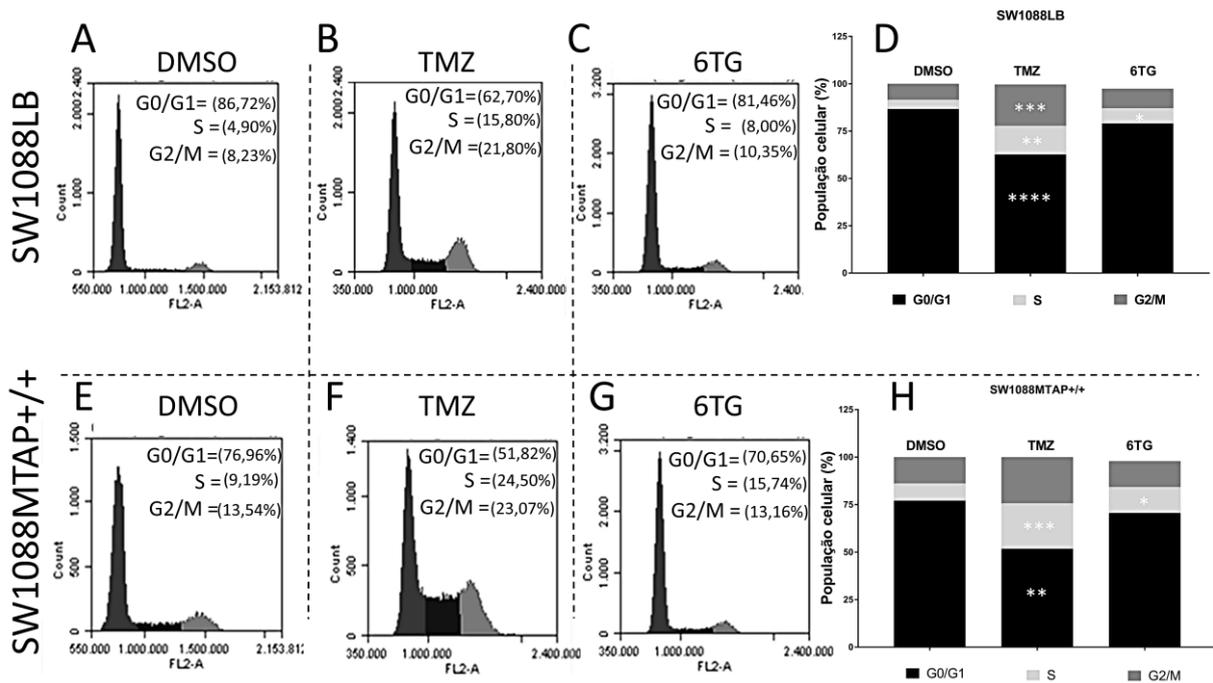


Figura 25 - Representação esquemática da análise do ciclo celular dos clones da linhagem celular SW1088MTAP+/+ e seu controle (SW1088LB), expostos aos fármacos 6-TG (IC50) e temozolamida (IC50) por 72 horas. Atividade do *cell sorter* com a análise da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular para os clones U251EV (A-C) e U251MTAP-/- (E-F). Gráfico de barras superpostas representativo do ciclo celular após exposição aos fármacos TMZ e 6TG, além do veículo DMSO para os clones U251EV (D) e U251MTAP-/- (H). Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Os resultados observados demonstraram que a exposição ao TMZ para o clone SW1088LB levou ao aumento da frequência das fases S e G2/M (Figura 25B e 25D; $p = 0,0063$ e $0,0002$) assim como uma redução em G0/G1 (Figura 25B e 25D; $p < 0,0001$). Com relação à exposição com 6TG, a diferença entre as frequências foi observada apenas para a fase S (Figura 25C e 25D; $p = 0,0256$). Quando avaliado o clone SW1088MTAP+/+, a exposição ao fármaco TMZ levou ao aumento da população celular na fase S (Figura 25F e 24H; $p = 0,0001$) e redução na fase G0/G1 (Figura 25F e 25H; $p = 0,0029$), quando comparados ao clone contendo DMSO (Figura 25E). Já em relação ao fármaco 6TG, foi observado um aumento na população de fase S (Figura 25G; $p = 0,0130$), sem alteração das demais fases do ciclo celular.

Quando comparadas as exposições com TMZ e 6TG entre os clones SW1088LB e SW1088MTAP+/+, observamos diferença significativa apenas para a população na fase G0/G1 exposto ao fármaco 6TG (Figura 25C e 25G; $p=0,0041$). Além disso, os resultados observados para os clones parentais U251WT e SW1088WT, foram similares aos observados para os clones U251EV e SW1088LB (dados não apresentados).

5.10 Análise de proliferação e migração de linhagem de glioma editada geneticamente após exposição ao agente alquilante (TMZ) e inibidor de síntese de purinas (6TG)

5.10.1 Avaliação da proliferação celular

Com o objetivo de avaliar como a presença ou a ausência do gene *MTAP* modularia o comportamento celular, após exposição aos fármacos TMZ e 6TG, foram testados os efeitos dos fármacos na proliferação dos clones editados geneticamente e comparados aos respectivos controles

Quando avaliamos o efeito citotóxico dos fármacos sobre a linhagem celular U251, foi observado que o tratamento do clone U251EV com 6TG em comparação ao clone contendo apenas DMSO, teve redução na proliferação celular inicialmente em 25%, após 15 horas do início da exposição atingindo 95% após 72 horas da adição (Figura 26A). De forma similar ao clone U251EV, a exposição com 6TG levou à redução na proliferação do clone U251MTAP-/-, sendo o início a partir de 6 horas da adição (Figura 26B). Quando avaliada a proliferação celular após exposição com o fármaco TMZ, observou-se que este efeito redutor foi de 50% após 48 horas para os clones U251EV e U251MTAP-/- comparados ao controle contendo DMSO. Após avaliação frente aos clones contendo DMSO, foi realizada a comparação entre ambos os fármacos. Os dados indicaram que ambos os fármacos reduziram a proliferação celular nos clones avaliados, sendo mais proeminente para o fármaco 6TG, com diferença estatisticamente significativa quando comparado à TMZ (Figura 26A-B; $p<0,05$). Interessante notar que, quando comparamos a exposição entre o clone silenciado frente ao seu controle, os dados não demonstraram diferença estatisticamente significativa na proliferação celular, tanto para a TMZ quanto para o fármaco 6TG (Figura 26C; $p>0,999$ e Figura 26D; $p>0,999$).

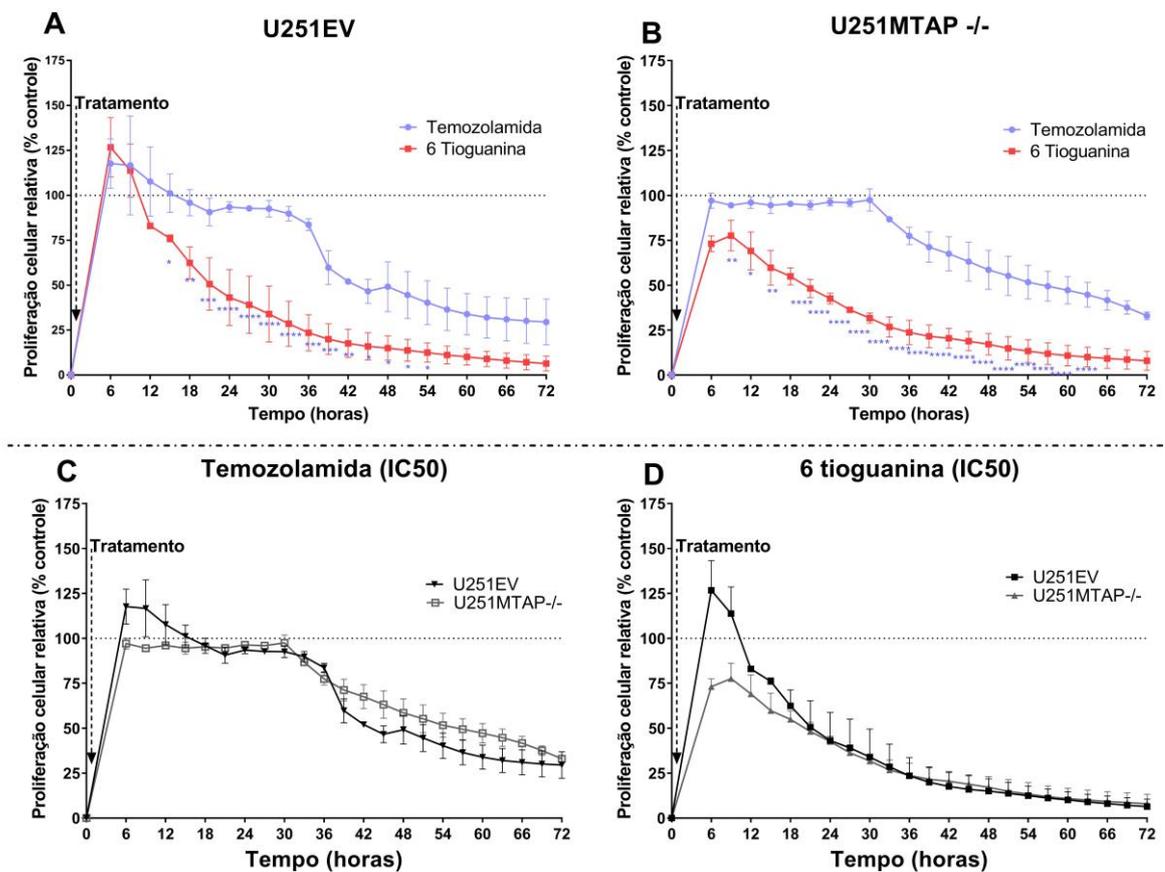


Figura 26 - Avaliação da proliferação celular medida em tempo real utilizando o equipamento xCELLigence para a linhagem U251 editada geneticamente. As células foram plaqueadas em densidade de 5×10^3 em E-plate 16, em duplicata. A-B) Efeito citotóxico dos fármacos 6TG e TMZ sobre a proliferação celular da linhagem parental U251 EV e U251 MTAP^{-/-}. C) Comparativo da proliferação celular entre o clone parental controle (U251EV) e o clone silenciado geneticamente (U251 MTAP^{-/-}) exposto à temozolamida (IC50) por 72 horas. D) Comparativo da proliferação celular entre o clone parental controle (U251EV) e o clone silenciado geneticamente (U251 MTAP^{-/-}) exposto à 6-tioguanina (IC50) por 72 horas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão a partir de três experimentos diferentes, realizado em duplicata comparado ao controle contendo DMSO. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

De forma similar, a mesma avaliação foi realizada para os clones da linhagem celular SW1088 (SW1088LB e SW1088MTAP^{+/+}) após adição dos fármacos 6TG e TMZ. Os resultados indicaram que a adição de TMZ induz a uma redução na proliferação celular para o clone

SW1088LB de 25%, a partir de 48 horas de adição atingindo a taxa de 50% após 72 horas, assim como para o clone SW1088MTAP+/+ (Figura 27A e 27B). Comparativamente, o clone SW1088MTAP+/+ apresentou aumento na proliferação celular, entre 6 e 36 horas após o início da exposição com TMZ, diferentemente do clone SW1088LB, entretanto sem diferença estatística (Figura 27C), assim como os resultados observados para a exposição com 6TG (Figura 27D).

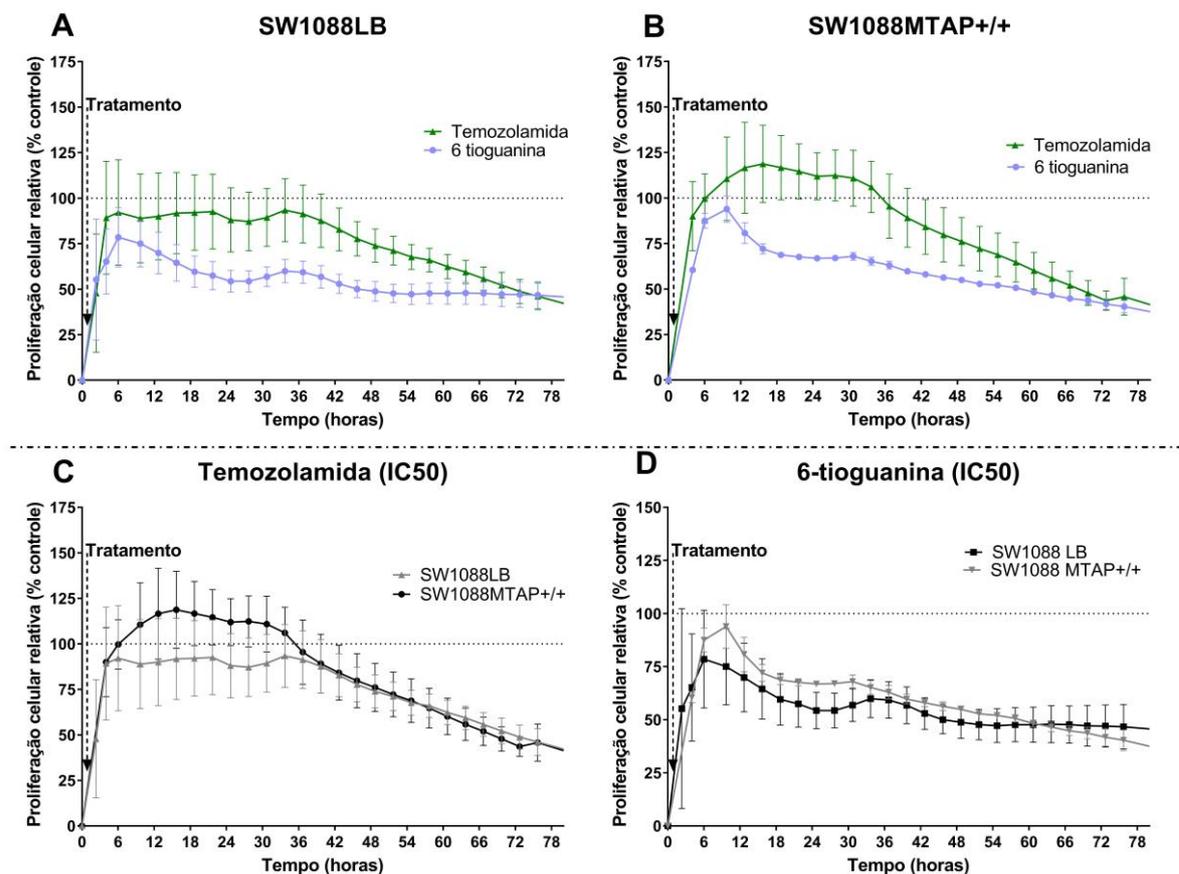


Figura 27 - Avaliação da proliferação celular medida em tempo real utilizando o equipamento xCELLigence para a linhagem celular SW1088 editada geneticamente. As células foram plaqueadas em densidade de 7×10^3 em E-plate 16, em duplicata. A-B) Efeito citotóxico dos fármacos 6TG e TMZ sobre a proliferação celular da linhagem parental SW1088 LB e SW1088 MTAP+/+. C) Comparativo da proliferação celular entre o clone parental controle (SW1088LB) e o clone superexpresso geneticamente (SW1088 MTAP +/+) exposto à temozolamida (IC50) por 72 horas. D) Comparativo da proliferação celular entre o clone parental controle (SW1088 LB) e o clone superexpresso geneticamente (SW1088 MTAP+/+) exposto à 6-tioguanina (IC50) por 72 horas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão a partir de dois

experimentos diferentes, realizado em duplicata. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Por fim, foi analisado o perfil de proliferação celular dos clones, U251MTAP^{-/-} vs. U251EV e SW1088MTAP^{+/+} vs. SW1088LB após exposição ao fármaco 6TG, e na presença de 5'-metiltioadenosina (MTA), afim de avaliar o potencial efeito de redução da citotoxicidade do substrato frente à exposição, para as células com presença de MTAP (Figura 28).

Os resultados observados, indicaram que os clones com a presença de expressão de MTAP U251EV (Figura 28A) e SW1088MTAP^{+/+} (Figura 28E), na presença de MTA, demonstraram um menor potencial citotóxico sob efeito do fármaco 6TG, quando comparado aos clones expostos apenas com o DMSO. O clone U251EV, apresentou uma redução de aproximadamente 60% na proliferação celular nas primeiras 24 horas do tratamento. Após esta fase, o clone na presença do substrato, voltou a apresentar proliferação celular, mantendo uma taxa de proliferação constante nas 48 horas posteriores. Por outro lado, o clone tratado apenas com 6TG, teve sua taxa de proliferação reduzida até próximo de 0% (Figura 28A, $p < 0,05$). Interessante notar que, o clone SW1088MTAP^{+/+} com expressão ectópica de MTAP, exposto ao 6TG, quando na presença de MTA apresentou redução na taxa de proliferação de aproximadamente 25% nas primeiras 24 horas, se estabilizando até completar as 72 horas de análise (Figura 28E).

Diferentemente, o clone sem a adição de MTA teve redução de aproximadamente 75% na taxa de proliferação, com diferença estatisticamente significativa (Figura 28E, $p < 0,05$). Em relação aos clones celulares sem a presença de MTAP, a presença ou a ausência de MTA não resultou em diferença nas taxas de proliferação celular para os clones U251MTAP^{-/-} e SW1088LB (Figura 28B e 28D). Estes dados podem ser confirmados pela razão de proliferação celular calculada pelo *slope* (Figuras 28C; $p = 0,0031$ e 27F; $p = 0,0011$).

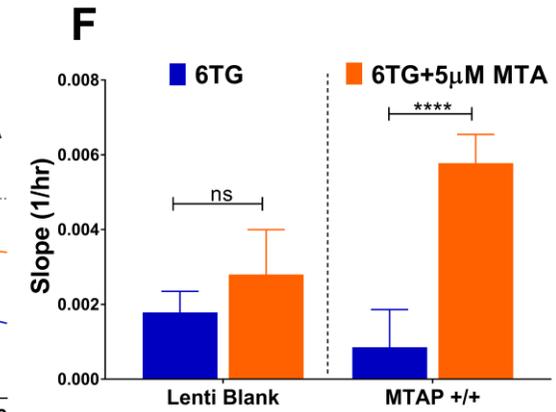
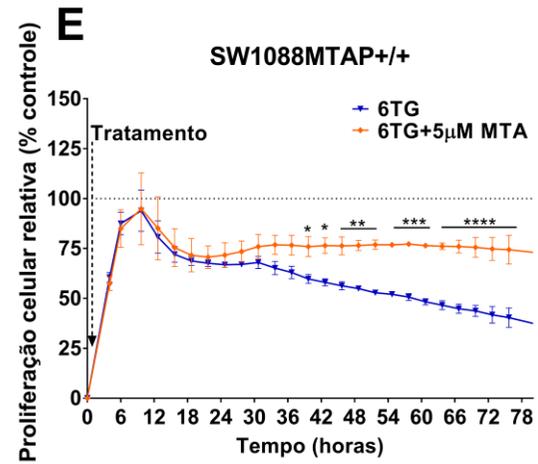
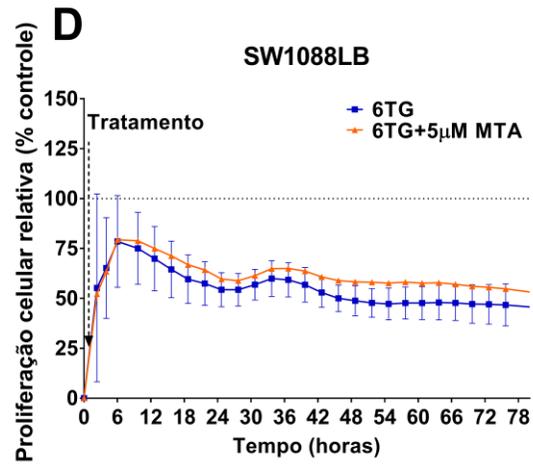
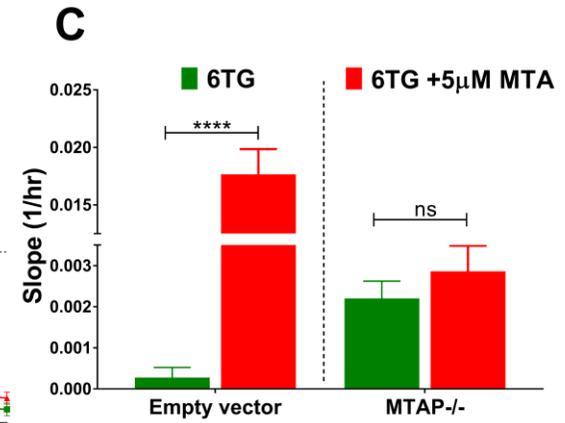
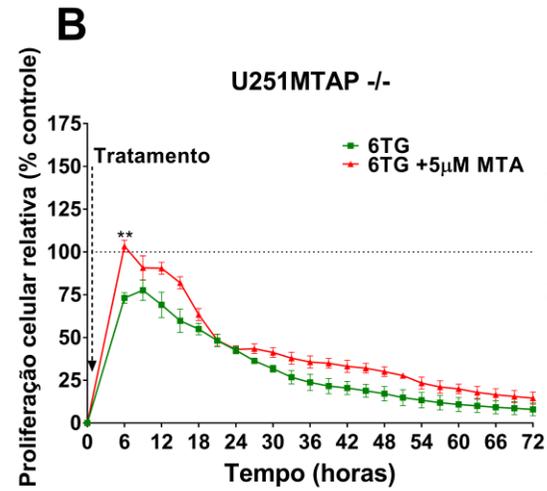
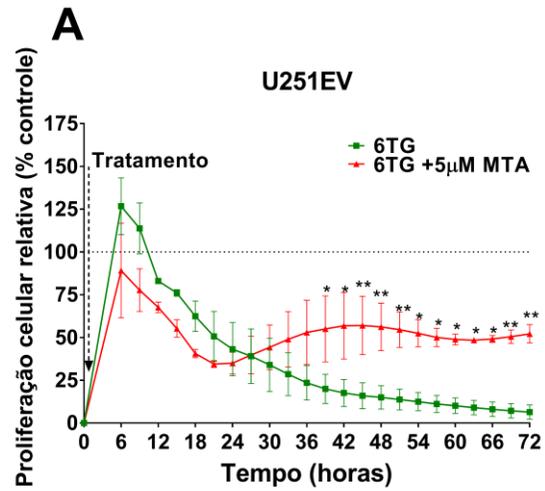


Figura 28 - Avaliação da proliferação celular dos clones editados geneticamente expostos farmacologicamente com 6TG. A) Efeito comparativo da citotoxicidade do fármaco 6TG comparado com a adição de 5'-metiltioadenosina sobre a linhagem celular parental U251 EV. B) Efeito comparativo da citotoxicidade do fármaco 6TG comparado com a adição de 5'-metiltioadenosina sobre a linhagem celular silenciada U251 MTAP^{-/-}. C) Razão de proliferação celular dos clones da linhagem celular U251 (U251EV e U251MTAP^{-/-}) expostos ao fármaco 6TG na presença ou não do substrato MTA. D) Efeito comparativo da citotoxicidade do fármaco 6TG comparado com a adição de 5'-metiltioadenosina sobre a linhagem celular parental SW1088 LB E) Efeito comparativo da citotoxicidade do fármaco 6TG comparado com a adição de 5'-metiltioadenosina sobre a linhagem celular superexpressa SW1088 MTAP^{+/+}. F) Razão de proliferação celular dos clones da linhagem celular SW1088 (SW1088LB e SW1088MTAP^{+/+}) expostos ao fármaco 6TG na presença ou não do substrato MTA. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão a partir de dois experimentos diferentes, realizado em duplicata comparado ao controle contendo DMSO. Abreviação: EV: empty vector, LB: Lenti Blank. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$, ns: não significativo.

5.10.2 Migração celular

A propriedade de migração das linhagens celulares expostas aos fármacos TMZ e 6TG foi avaliada em ensaios de suporte celular permeável em placa contendo 24 insertos. Além disso, a hipótese da redução do efeito citotóxico do fármaco 6TG pelo substrato MTA também foi avaliado entre os clones editados geneticamente.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar uma menor taxa de migração dos clones expostos aos fármacos 6TG e TMZ quando comparado ao controle (DMSO) (Figura 29A). Para o clone U251EV, o fármaco 6TG levou à redução de 50,5% quando comparado ao controle (Figura 29A; $p < 0,0001$). Por outro lado, o clone U251EV exposto ao fármaco 6TG contendo MTA, não apresentou diferença significativa ao clone controle contendo apenas DMSO (Figura 29A; $p = 0,0936$). Assim como para o fármaco 6TG, a TMZ levou à redução da migração celular em aproximadamente 35% em 24 horas de experimento (Figura 29A; $p = 0,0015$).

Especificamente para o efeito com 6TG na presença e ausência de MTA, observamos que apenas para o clone contendo MTA (U251EV), o efeito quimioprotetor se mostra presente (Figura 29B; $p < 0,0001$), que por sua vez não apresentou diferença para o clone U251MTAP^{-/-} (Figura 29E; $p = 0,6260$). Comparativamente, o efeito citotóxico causado pelos fármacos 6TG e TMZ, não apresentaram diferença significativa, tanto para o clone U251EV quanto para o clone U251MTAP^{-/-} (Figura 29C; $p = 0,2363$ e Figura 29F; $p = 0,9907$).

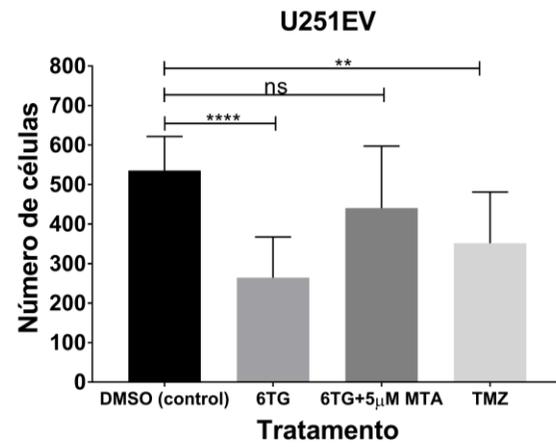
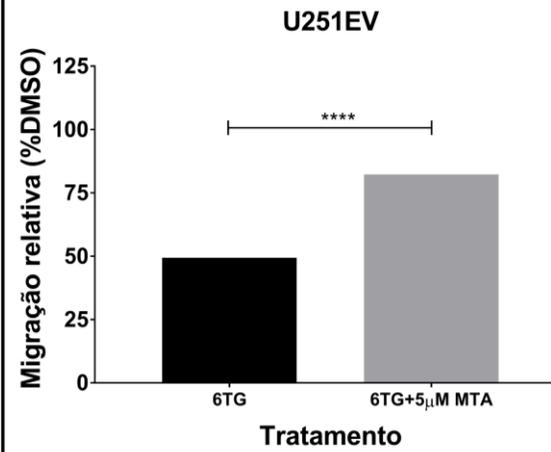
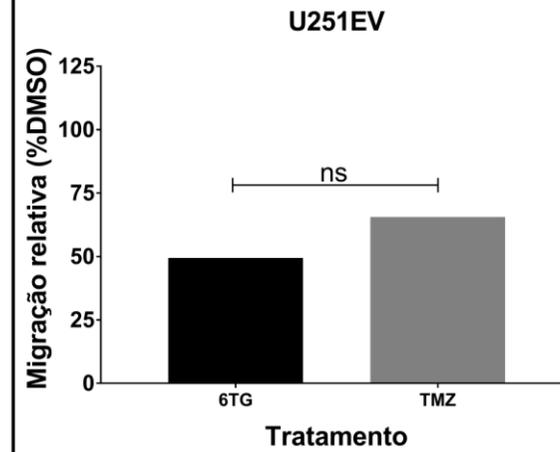
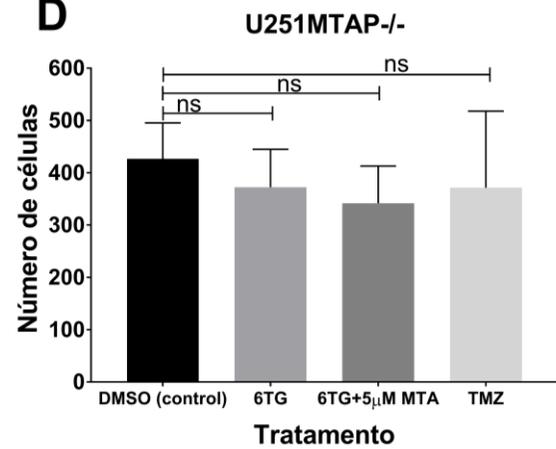
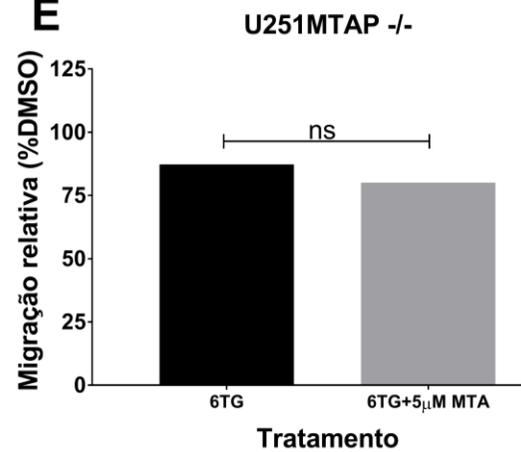
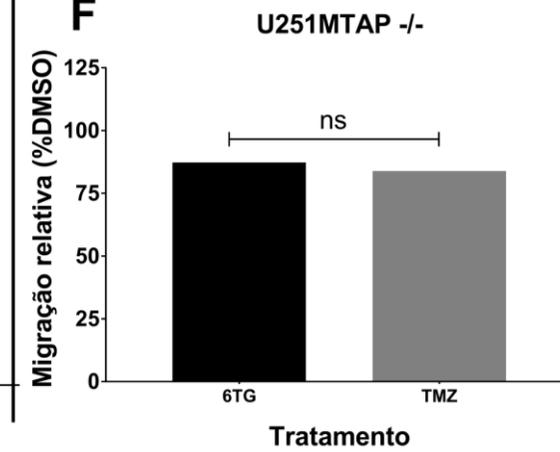
A**B****C****D****E****F**

Figura 29 - Avaliação da migração celular para os clones U251 EV e U251MTAP^{-/-}. A/D) O efeito de TMZ e 6TG contendo ou não MTA em relação ao veículo (DMSO). B/E) Comparativo do efeito citotóxico do fármaco 6TG ou 6TG contendo 5uM de MTA sobre os clones U251 EV e U251 MTAP^{-/-}. C/F) Comparativo do efeito citotóxico do fármaco 6TG ou TMZ sobre os clones U251 EV e U251 MTAP^{-/-}. Os gráficos são representativos da migração celular do meio DMEM sem suplementação (0% SFB) para meio suplementado (10% SFB), após 24 horas de exposição. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão a partir de dois experimentos independentes, realizado em duplicata. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$, ns: não significativo.

Por fim, foram comparadas as taxas de migração celular, entre os dois grupos (U251 EV x U251 MTAP^{-/-}) e de acordo com os resultados, não foi observado diferença significativa na taxa de migração para o clone U251 MTAP^{-/-} em relação ao clone U251EV, em presença de 6TG (Figura 30A; $p>0,2408$), 6TG+MTA (Figura 30B, $p>0,1839$), e TMZ (Figura 30C; $p>0,5951$).

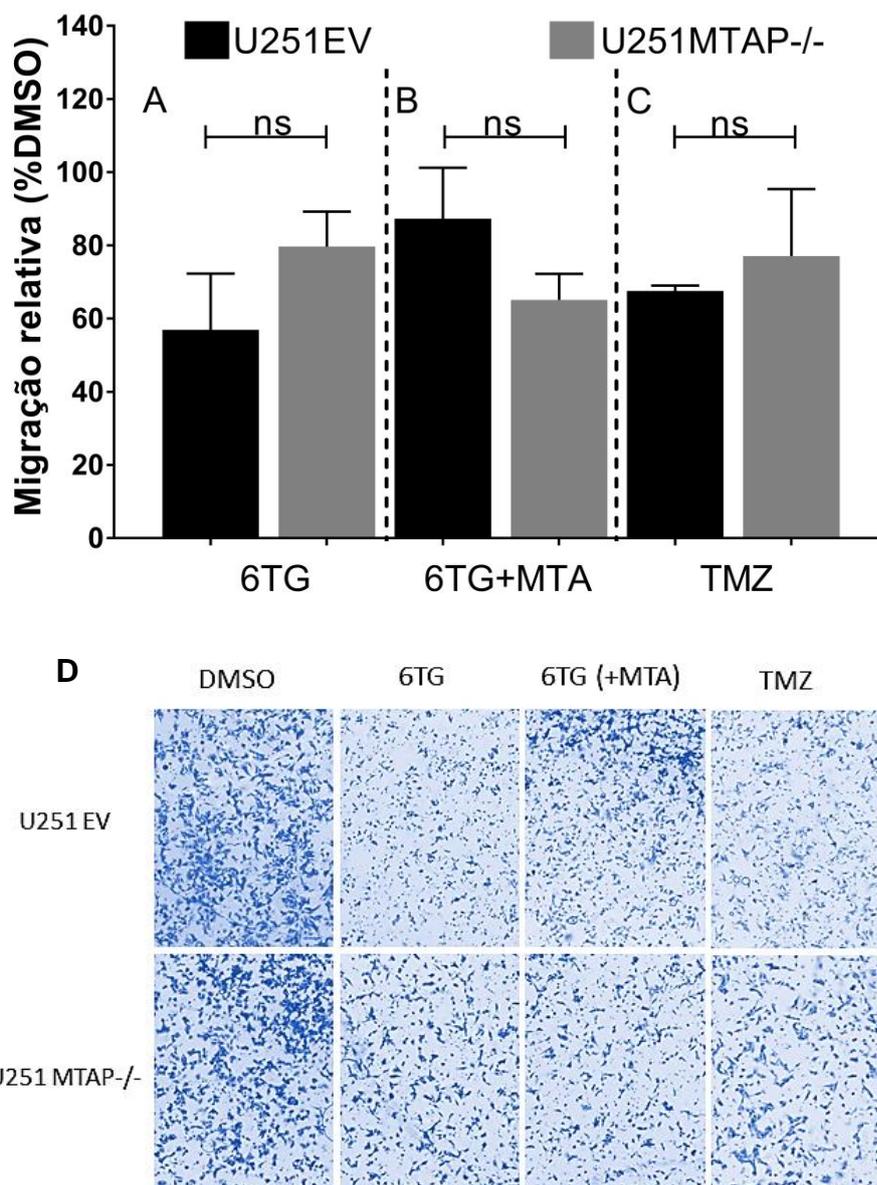


Figura 30 - Avaliação da taxa migratória celular dos clones U251EV e U251MTAP^{-/-} expostos a 6TG e TMZ. Número de células dos clones U251EV e U251MTAP^{-/-} expostos aos fármacos 6TG (A), 6TG suplementado com 5 μ M de 5'-metiltioadenosina (B) e temozolamida (C). D) Imagem representativa do efeito citotóxico dos fármacos sobre os clones da linhagem celular U251EV e U251MTAP^{-/-}. Os gráficos são representativos da migração celular do meio DMEM sem

suplementação (0% SFB) para meio suplementado (10% SFB) em inserto *transwell*, após 24 horas de adição.

Assim como para a linhagem U251, também foi avaliada a taxa de migração celular da para os clones da linhagem celular SW1088. De forma geral, os resultados demonstraram efeito citotóxico dos fármacos 6TG e TMZ, sobre os clones SW1088LB e SW1088MTAP+/. Para o clone SW1088LB, o fármaco 6TG levou a redução de aproximadamente 30% da migração celular, quando comparado ao clone contendo DMSO (Figura 31A; $p=0,0244$), e de 40% para o clone suplementado com MTA (Figura 31A; $p=0,0057$). Já em relação ao fármaco TMZ, a redução não demonstrou diferença significativa (Figura 31A; $p=0,1972$).

Em relação ao clone SW1088MTAP+/, os resultados demonstraram que a exposição celular ao fármaco 6TG teve uma redução de 28% comparado ao controle contendo DMSO (Figura 31D, $p=0,1084$). Já na presença do fármaco 6TG contendo o substrato MTA, a redução foi de aproximadamente 19% (Figura 31D, $p=0,3572$), ao contrário do observado para o clone SW1088LB (Figura 31A). Além disso, o 6TG, na presença de MTA, reduziu o efeito citotóxico de 6TG para o clone SW1088MTAP+/, elevando a levou ao aumento da migração celular em 5,4% em relação ao exposto com 6TG, entretanto sem diferença significativa (Figura 31E, $p=0,6857$). Com relação ao fármaco temozolamida, se mostrou mais citotóxica ao clone SW1088MTAP+/+ (Figura 31D, $p=0,0111$) do que ao clone SW1088LB (Figura 31A, $p=0,1972$) quando comparado aos respectivos controles contendo DMSO. Por fim, não houve diferença significativa entre os fármacos 6TG e TMZ, para os clones SW1088LB e SW1088MTAP+/+ (Figura 31C, $p=0,5867$ e Figura 31F, $p=0,1143$).

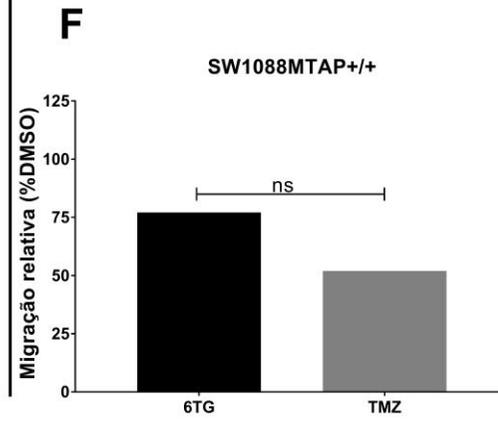
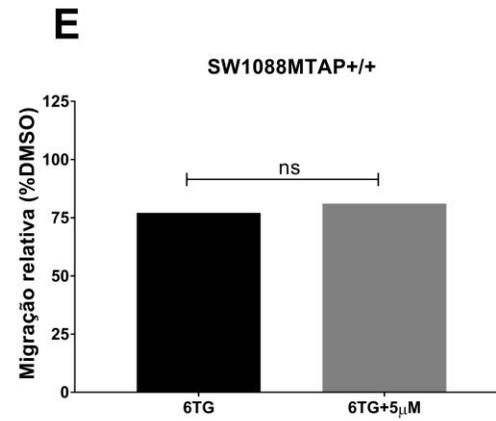
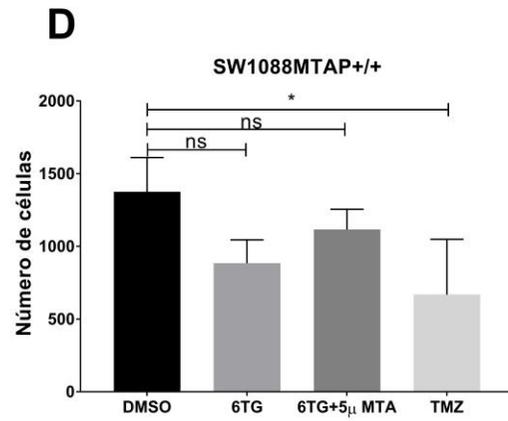
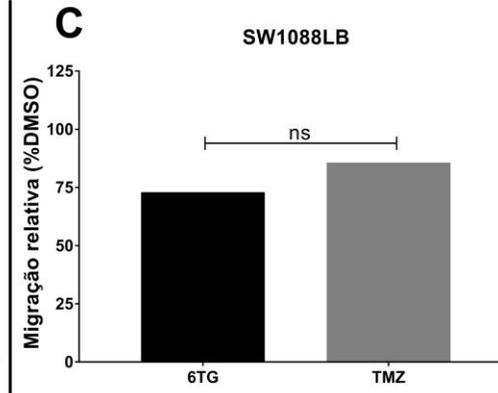
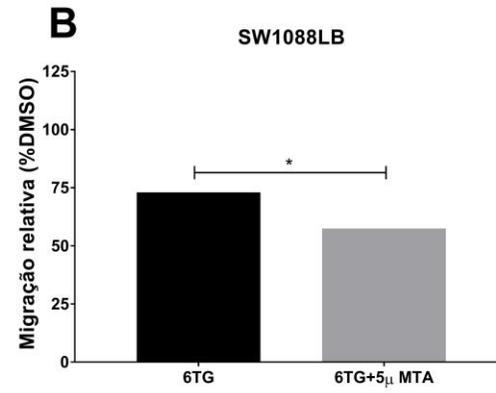
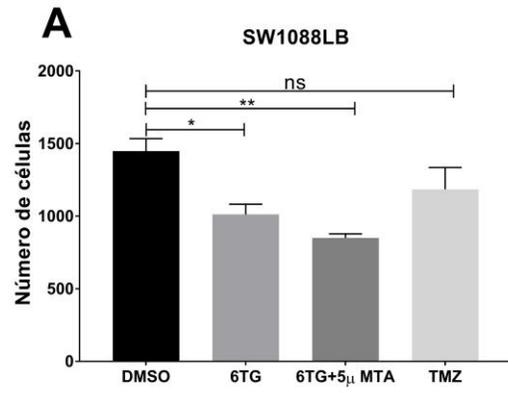


Figura 31 - Avaliação da migração da linhagem celular SW1088 controle (SW1088LB) e superexpressa (SW1088MTAP+/+). A/D) O efeito de TMZ e 6TG contendo ou não MTA em relação ao veículo (DMSO). B/E) Comparativo do efeito citotóxico do fármaco 6TG ou 6TG contendo 5uM de MTA sobre os clones SW1088LB e SW1088MTAP+/+. C/F) Comparativo do efeito citotóxico do fármaco 6TG ou TMZ sobre os clones SW1088LB e SW1088 MTAP+/+. Os gráficos são representativos da migração celular do meio DMEM sem suplementação (0% SFB) para meio suplementado (10% SFB), após 24 horas de exposição.

Quando avaliado comparativamente a exposição dos clones SW1088 LB e SW1088 MTAP+/+ aos fármacos TMZ e 6TG suplementado ou não com MTA, foi observado que a inserção do gene *MTAP*, não alterou o efeito citotóxico do fármaco 6TG comparado ao clone SW1088LB (Figura 32A, $p=0,7843$), assim como observado para a exposição dos clones ao fármaco TMZ (Figura 32C, $p=0,1077$). Entretanto, quando os clones foram expostos ao fármaco 6TG, suplementado com o substrato MTA, o clone SW1088MTAP+/+, se mostrou mais resistente comparado ao clone SW1088LB (Figura 32B, $p=0,0471$).

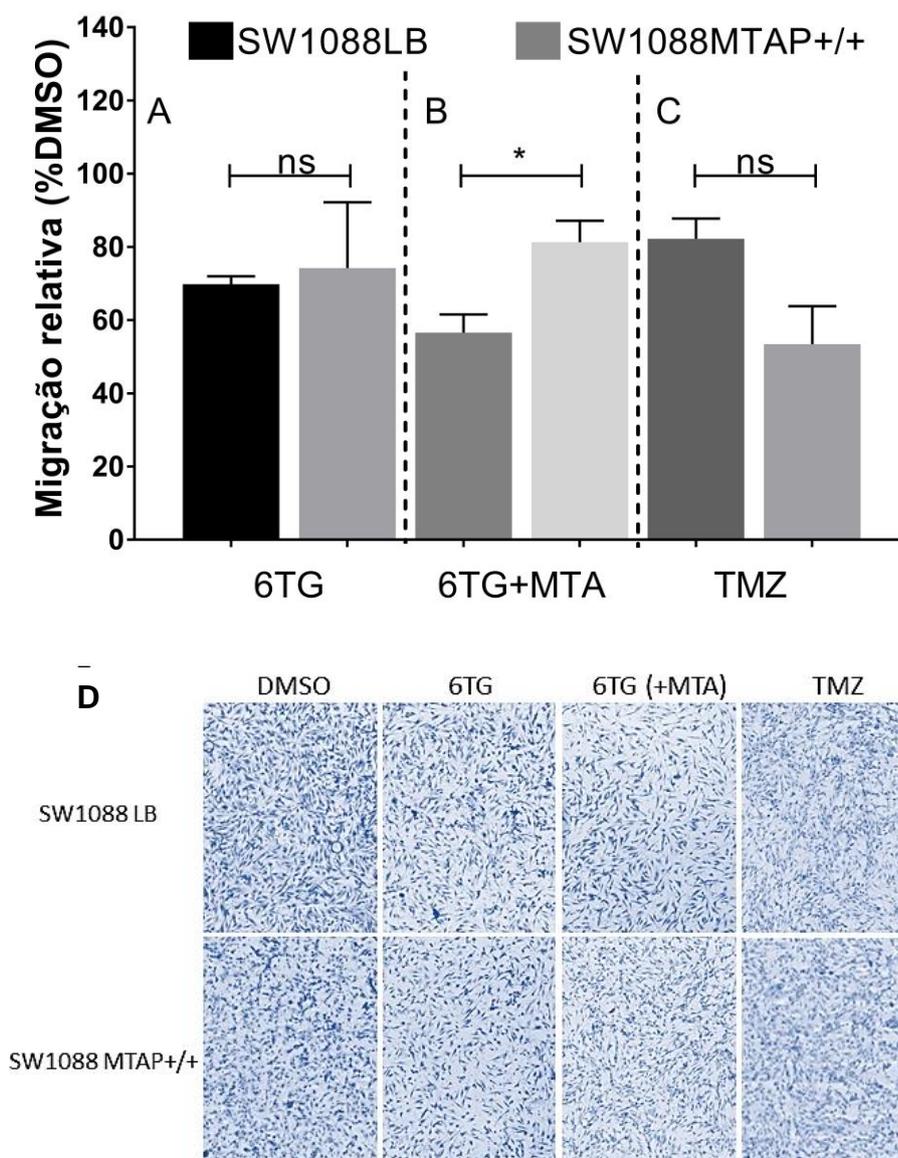


Figura 32 - Avaliação da taxa migratória celular dos clones SW1088LB e SW1088MTAP+/+ expostos aos fármacos 6TG e TMZ. Taxa migratória dos clones SW1088LB e SW1088MTAP+/+ contendo o veículo DMSO (A) ou os fármacos 6TG (B), 6TG suplementado com 5 μ M de 5'-metiltioadenosina (C) e temozolamida (D). E) Imagem representativa do efeito citotóxico dos

fármacos sobre os clones da linhagem celular SW1088LB e SW1088MTAP+/+. Os gráficos são representativos da migração celular do meio DMEM sem suplementação (0% SFB) para meio suplementado (10% SFB) em inserto transwell, após 24 horas de exposição.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, almejamos a caracterização do gene *MTAP* em gliomas, através da análise de sua expressão, em uma ampla série de pacientes com diagnóstico de glioma e linhagens celulares, avaliando o impacto de sua deleção na sobrevida média global destes pacientes. Além disso, através de edição gênica, avaliou-se o efeito da perda ou ganho de função do gene em linhagens previamente selecionadas U251 e SW1088, com foco nas alterações moleculares assim como no papel supressor tumoral do gene *MTAP*, atuando como possível alvo biomarcador para os gliomas.

Inicialmente, através da análise *in silico*, foi observado, em 48% (168/350) dos casos, houve a perda do locus 9p21, estando associada diretamente com a redução nos níveis de expressão de *MTAP*. Estes resultados corroboram os achados de Zhao e Zhao¹⁴⁶ em um estudo com genes supressores tumorais que reportou a associação entre a perda de 9p21 e a redução da expressão gênica de *MTAP*. Além disso, a deleção do locus 9p21 foi diretamente associado com a redução da expressão gênica e proteica de *MTAP*¹¹⁷. Esta região tem papel importante, já que o gene *MTAP* está localizado em um sítio cromossômico frágil¹⁴⁷. A deleção desta região leva à perda de genes com papéis importantes no desenvolvimento celular como o gene *CDKN2A* e *CDKN2B*, que regulam ciclinas dependentes de cinases que, quando deletados, podem levar ao descontrole da proliferação celular e contribuir com o desenvolvimento tumoral e conseqüentemente, o pior prognóstico em vários tipos de tumores incluindo os gliomas^{82, 148-150}.

A perda da região 9p21 é relativamente rara em gliomas de grau I, mas frequente em gliomas de grau IV¹²¹. Nossos achados, combinados com a seleção de outros biomarcadores como *CDKN2A/B* poderiam ser utilizados na predição da deleção da região 9p21 contribuindo para a melhor estratificação e vigilância mais rigorosa destes pacientes. Como a perda de expressão de *MTAP*, também pode estar associada à fatores epigenéticos¹⁰⁴, foi então analisado a associação entre a perda de expressão e o status de metilação do promotor do gene *MTAP*. Os resultados contrastam com o estudo recente que encontrou uma associação significativa da metilação de *MTAP* e a expressão gênica.¹⁵¹ Hansen et al., observaram um coeficiente de determinação (R^2) de 0,19 e coeficiente de correlação de 0,44 (R), valores baixos em relação ao considerado como correlação forte (>0,6), levantando a hipótese de ser

importante interpretar a associação entre a metilação do promotor do gene e a perda de expressão com cautela.¹⁵¹

Foi também avaliado o perfil de expressão de *MTAP* em uma série de subtipos moleculares de glioblastoma^{88,87}. Utilizando a série de glioblastomas (TGCA-GBM), observou-se que a perda de expressão de *MTAP* foi maior para o subtipo clássico com 65,2% dos casos, corroborando com estudos prévios que associaram o subtipo clássico com a perda do gene *CDKN2A*, que está localizado próximo ao gene *MTAP*¹²². Por outro lado, somente 7,4% do subtipo G-CIMP apresentaram perda de expressão, sendo que este subtipo molecular é frequentemente associado à glioblastoma secundário, que apresentam mutação de *IDH1* e progridem de lesões precursoras de baixo grau^{74, 87, 89}.

Buscando estender nossos achados, também foi avaliado o perfil de expressão proteica de *MTAP* e seu valor prognóstico em uma série contendo 641 casos de glioma, além de um painel de linhagens celulares estabelecidas e linhagens celulares originadas de tumores primários. Em geral, foi observado a perda de expressão para os subtipos com maior grau de malignidade como os subtipos adulto e pediátrico de glioblastoma atingindo cerca de 45% em pacientes adultos e aproximadamente 55% em pacientes pediátricos. Interessante notar que estes dados foram inesperados e talvez sugiram que a série de glioblastomas pediátricos tenham perfil histológico do subgrupo clássico do tipo *receptor tyrosine kinase* (RTK) II. Estes tumores exibem características de alterações no número de cópias similares aos glioblastomas adultos^{47, 152}. Além disso, em estudo desenvolvido por Frazão et al.¹²¹, foram identificados poucos casos de deleção em gliomas de grau I (12,2%) mas frequente perda de 9p21 em gliomas de alto grau (62,5%). Por fim, também foi observado que os dados contrastam com o obtido em pacientes com diagnóstico de astrocitoma pilocítico (Grau I) que apresentou perda de expressão em aproximadamente 15% dos casos, anteriormente reportada pelo nosso grupo.¹¹⁹ Estes resultados estão em linha com o reportado por Suzuki et al.¹⁵³, que identificaram uma alta frequência de deleção de *MTAP* (60%) em glioblastomas sendo mais raro a deleção em gliomas de baixo grau.¹²¹ Para as linhagens celulares, foi observado perda de expressão nas linhagens de glioma de alto grau, contrastando com as linhagens originadas de tumores de baixo grau (40% vs. 0%). Também não foi observado a perda de expressão em linhagens de glioblastoma pediátricas, enquanto 50% (4/8) das linhagens adultas de glioblastoma apresentaram a perda de expressão de *MTAP*. A baixa perda de expressão nas linhagens gliomas de alto grau pediátricas estão em linha ao observado na literatura, que

apresentam frequência de 10 a 19%^{152 59}. Estes dados em conjunto, sugerem a associação entre a deficiência de *MTAP* com o maior grau de malignidade e subtipo histológico dos gliomas, como observado na literatura^{117, 119, 120, 153, 154}.

Apesar da maior perda de expressão de *MTAP* estar presente em gliomas de alto grau, quando avaliado a associação entre a expressão de *MTAP* e o prognóstico dos pacientes, foi observado entre os subgrupos com glioma de alto grau e glioblastoma adulto, surpreendentemente, observou-se que a perda de expressão de *MTAP* está associado a um melhor prognóstico. Uma hipótese que poderia explicar este fato é que os pacientes diagnosticados com o subtipo clássico (deleção frequente de 9p) apresentam melhor sobrevida após terapia intensiva com quimio e radioterapia⁸⁸. A série analisada, é composta de pacientes com características de glioblastoma primário (idade mediana 59 anos, *IDH1*-mutado em 3,9%) com 79% (287/363) pacientes submetidos a tratamento quimio ou radioterápico, corroborando este resultado. Complementarmente, entre a série de casos de glioblastoma obtido do Oncomine e TCGA-GBM e analisado através de ferramenta de bioinformática, apenas para o dataset Freije (n=19), a expressão de *MTAP* apresentou um melhor prognóstico aos pacientes, sendo que os demais não apresentaram diferença significativa. Em recente estudo, Hansen et al avaliando a sobrevida livre de doença com os dados do dataset TCGA-GBM, reportaram um pior prognóstico para o grupo com deleção de *MTAP*¹⁵¹. Contudo, quando analisamos o mesmo GBM dataset, não observamos diferença entre os grupos (Anexo K). Uma das hipóteses para esta diferença, seria o uso de apenas os eventos de recaída, censurando os eventos por morte no trabalho de Hansen et al¹⁵¹, diferentemente do analisado por nosso grupo que considerou os eventos de recaída e os eventos de morte, normalmente mais utilizado na análise de sobrevida livre de doença. Estes resultados em conjunto, sugerem a falta de associação entre a perda de *MTAP* e o prognóstico em pacientes com glioblastoma.

O perfil de expressão gênica das linhagens celulares editadas geneticamente mostrou uma alteração significativa à genes associados as vias RAS/MAPK/PI3K-AKT e vias de apoptose para a linhagem com deleção de *MTAP*. Estas vias apresentam papel fundamental em diversos processos fisiológicos, tais como proliferação diferenciação sobrevida e morte celular¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Dos nove genes diferencialmente expressos, cinco estão associados a via PI3K-AKT, sendo *FN1*, *NGFR* e *THBS1* associados a progressão tumoral¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Por outro lado, *ANGPT1* e *COL11A1* estão associados ao melhor prognóstico em tumor pulmonar e

proliferação em câncer colorretal ^{161, 162}. Além disso, o gene *TNFSF10* superexpresso no clone U251MTAP^{-/-} está associado com processos pro-apoptóticos por ativação de caspase 8 ^{163, 164}. O clone SW1088MTAP^{+/+}, entretanto teve apenas os genes *GPC4* e *IL13RA2*, com alteração de expressão. Estes genes apresentam função controversa em vários tumores promovendo e inibindo tumores ¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. Os dados dos ensaios funcionais apresentados, também sugerem que os clones U251MTAP^{-/-} e SW1088MTAP^{+/+} não indicaram agir regulando os processos de proliferação, migração e invasão celular. Estes resultados estão em linha com o observado em análise de expressão de genes comumente associados à agressividade tumoral. Dentre os genes avaliados, apenas *FN1* e *MAPK10* (U251MTAP^{-/-} vs. U251EV) apresentaram expressão diferencial.

Um recente estudo com câncer de próstata demonstrou crescimento similares para as células com deleção de MTAP comparada ao controle ¹⁶⁹. Também foi reportado em um estudo com carcinoma hepatocelular que a reexpressão de MTAP não modificou a taxa de proliferação celular quando comparado ao controle ¹¹². O gene *MTAP* tem sido reportado como um importante regulador terapêutico, podendo contribuir para terapias seletivas com tiopurinas, juntamente com a hipótese do uso do substrato MTA como um quimioprotetor celular para as células MTAP-positivas em detrimento daquelas com ausência da expressão de MTAP, ofereceria a oportunidade de uma nova estratégia de tratamento direcionado ^{92, 129, 151, 170}.

Os nossos resultados demonstraram que o tratamento com o fármaco 6TG, na presença de MTA leva à interferência do metabolismo celular para as células com deleção do gene *MTAP*, interferindo nos processos de crescimento celular e migratórios, além de elevar a resistência das células ao fármaco 6TG com expressão de *MTAP*. Estes resultados estão em linha com o observado por Lubin e Lubin¹⁰⁴ que, utilizando em seu estudo células de fibroblasto humano e linhagem de leucemia mieloblástica (ML-1) que expressam MTAP e tratados com 6TG, apresentaram forte redução no crescimento celular que então foi posteriormente revertido pela presença de MTA. Além disso, foi observado que o uso de MTA permitiu o aumento do índice terapêutico de 6TG para tumores como mesotelioma protegendo as células normais da citotoxicidade do fármaco ¹⁷⁰. *In vivo*, um estudo conduzido com camundongos NOD-SCID com leucemia de células T humanas apresentando deleção de *MTAP*, pré-tratados com MTA e posteriormente tratados com 6TG, apresentaram redução das células tumorais ⁹². Interessante notar que em nossos dados, a expressão ectópica do gene

MTAP também levou à resistência ao tratamento frente à 6TG quando suplementado com MTA, sugerindo que a presença de MTA tenha efeito quimioprotetor. Além disso, como observado por Pérez et al ¹⁷¹ o uso de MTA atua de forma a inibir a proliferação celular de melanoma *in vitro* e *in vivo* e induzindo apoptose em câncer colorretal ¹⁷². No entanto, no contexto da estratégia de tratamento, o status da *MTAP* como fator de vulnerabilidade molecular visando o aumento da eficácia do tratamento em pacientes com glioma deve ser estudado com cautela. Claramente, um melhor entendimento das possíveis vulnerabilidades moleculares diretas e indiretas da deleção de *MTAP* são necessárias.

Em resumo, o trabalho demonstrou que a perda de *MTAP* é frequente em gliomas de alto grau. Apesar disso, nossos dados *in silico* e *in vitro* sugerem que a deleção não é um evento com importância biológica determinante no processo do desenvolvimento tumoral com impacto na sobrevida dos pacientes. Entretanto, a abordagem de tratamento com tiopurinas em tumores que apresentem como característica a deleção de *MTAP* e suplementados com MTA sugere uma hipótese a ser considerada para aumentar a eficácia em pacientes com glioma.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que a perda da expressão de *MTAP* é um evento associado a deleção da região 9p21, não apresentando uma associação direta com fatores epigenéticos como o status de metilação da região promotora do gene *MTAP*.

A perda de expressão de *MTAP* é um evento mais frequentemente associado a gliomas de alto grau, provavelmente devido à presença de diversas alterações moleculares como mutações e deleções nestes subtipos, entre elas a frequente co-deleção dos genes *CDKN2A/B* e *MTAP*. Além disso, na avaliação *in vitro*, o efeito basal da modulação gênica indicou que a perda de *MTAP* não apresenta efeitos biológicos relevantes nos gliomas, além de não apresentar impacto clínico na sobrevida global e sobrevida livre de doença dos pacientes avaliados, como um gene supressor clássico. Estes resultados levantam a hipótese de que este gene possa ter um papel indireto ou se apresentar como um gene “passenger” no processo de desenvolvimento tumorigênico.

A exposição dos clones celulares aos fármacos temozolamida e 6-tioguanina indicou um efeito citotóxico importante, afetando o ciclo celular dos clones avaliados quando comparado ao veículo DMSO. Especificamente, a exposição ao fármaco temozolamida aumentou a citotoxicidade para os clones editados geneticamente (U251MTAP^{-/-} e SW1088MTAP^{+/+}), entretanto, para o fármaco 6-tioguanina, este efeito foi observado apenas para o clone U251MTAP^{-/-}. Estes resultados podem sugerir que a haja um efeito de modulação da própria linhagem celular na resistência ao fármaco utilizado. Contudo, assim como avaliado a função do gene sem ação farmacológica; quando comparamos o efeito na proliferação e migração celular sob efeito da exposição aos fármacos, não foi observada diferença significativa entre os clones editados geneticamente (U251MTAP^{-/-} e SW1088MTAP^{+/+}) comparado aos clones controles utilizados (U251EV e SW1088LB).

Em suma, o nosso estudo indica que o *MTAP* desempenha um papel biológico pouco relevante na gliomagenese. Constatamos *in vitro*, que a suplementação com substrato 5'-metiltioadenosina (MTA), substrato da enzima *MTAP*, recuperou parcialmente as funções originais dos clones com presença do gene *MTAP*, o que indica um possível caminho para o desenho de um tratamento personalizado com vistas a utilizar a deleção do gene como alvo terapêutico, utilizando a ação dos fármacos derivados de tiopurinas, suplementado ao MTA.

REFERÊNCIAS

1. Machado ABM, Haertel LM. *Neuroanatomia funcional*. 3 ed. Atheneu, editor. **São Paulo**2014. 344 p.
2. Sobotta J. *Atlas de Anatomia Humana*. 24 ed: **Guanabara Koogan**; 2018.
3. Friston KJ. *Functional integration in the brain*. In: Karl Friston CF, Raymond Dolan, Cathy Price, Semir Zeki, John Ashburner, William Penny, editor. *Human Brain function: Academic Press* 2004.
4. Lent R. *Cem bilhões de neurônios? conceitos fundamentais de neurociência*. Atheneu, editor. **São Paulo**2010. 765 p.
5. Afifi AK, Bergman RA. *Neuroanatomia funcional: texto e atlas*. 2 ed. Roca, editor. **São Paulo**2008. 526 p.
6. Marieb EN. *Fundamentos de anatomía y fisiología humana: Pearson Learning Solutions*; 2015.
7. Rasband WS. *Image J. US National Institutes of Health*. 1997-2018.
8. Junqueira LC, Carneiro L. *Histologia básica: Sistema Nervoso*. **São Paulo**2008. 524 p.
9. Taverna E, Gotz M, WB H. *The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of development and evolution of neocortex*. **Annu Rev Cell Dev**. 2014;30:465-502.
10. Yamaguchi M, Seki T, Imayoshi I, Tamamaki N, Hayashi Y, Tatebayashi Y, et al. *Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain*. **J Physiol Sci**. 2016;66(3):197-206.
11. Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, et al. *Glioma*. **Nat Rev Dis Primers**. 2015;1:15017.
12. Rowitch DH. *GLIAL SPECIFICATION IN THE VERTEBRATE NEURAL TUBE*. **Nature reviews**. 2004;5:409-19.

13. Rowitch DH, Kriegstein AR. *Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification*. **Nature**. 2010;468(7321):214-22.
14. Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. *Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage*. **Development**. 2000;127(24):5253-63.
15. Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M. *Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons*. **Neuron**. 2001;31(5):727-41.
16. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. *Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex*. **Nature**. 2001;409(6821):714-20.
17. Naruse M, Ishizaki Y, Ikenaka K, Tanaka A, Hitoshi S. *Origin of oligodendrocytes in mammalian forebrains: a revised perspective*. **J Physiol Sci**. 2017;67(1):63-70.
18. Felten DL, O'Banion MK, Maida MS. *Neurons and Their Properties*. In: Elsevier, editor. *Netter's Atlas of Neuroscience*. Third Edition ed2016.
19. Butt AM. *Oligodendrocyte Morphology*. In: Squire LR, editor. *Encyclopedia of Neuroscience*2009. p. 203-8.
20. Nicoll JA, Weller RO. *A new role for astrocytes: beta-amyloid homeostasis and degradation*. **Trends Mol Med**. 2003;9(7):281-2.
21. (INCA) INdCJAGdS. *Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil* In: ENSINO CD, editor. *Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil* **Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)**; 2019. p. 117.
22. Nowell PC. *The clonal evolution of tumor cell populations*. **Science**. 1976;194(4260):23-8.
23. Greaves M, Maley CC. *Clonal evolution in cancer*. **Nature**. 2012;481(7381):306-13.
24. Kaiser C, Krieger M, Lodish H, Berk A. *Molecular Cell Biology*. 8th revised edition ed. **New York: W.H freeman & Co Ltd**; 2016.
25. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. *Epigenetics in cancer*. **Carcinogenesis**. 2010;31(1):27-36.
26. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.

27. Hanahan D, Weinberg RA. *The Hallmarks of Cancer*. **Cell**. 2000;100(1):57-70.
28. Martin-Moreno JM, Soerjomataram I, Magnusson G. *Cancer causes and prevention: a condensed appraisal in Europe in 2008*. **Eur J Cancer**. 2008;44(10):1390-403.
29. Jiang Y, Uhrbom L. *On the origin of glioma*. **Upsala Journal of Medical Sciences**. 2012;117:113-21.
30. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. *Cancer stem cells in glioblastoma*. **Genes & Development**. 2015;29:1203-17.
31. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015*. **Neuro Oncol**. 2018;20(suppl_4):iv1-iv86.
32. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, et al. *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. **Int J Cancer**. 2019;144(8):1941-53.
33. Ferris SP, Hofmann JW, Solomon DA, Perry A. *Characterization of gliomas: from morphology to molecules*. **Virchows Arch**. 2017;471(2):257-69.
34. Collins VP, Jones DTW, Giannini C. *Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. **Acta Neuropathologica**. 2015;129(6):775-88.
35. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. **Acta Neuropathol**. 2016;131(6):803-20.
36. Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK. *Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas*. **Cancer**. 1997;79(7):1381-93.
37. Perry A, Wesseling P. *Histologic classification of gliomas*. **Handb Clin Neurol**. 2016;134:71-95.
38. Reifenberger G, Wirsching HG, Knobbe-Thomsen CB, Weller M. *Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2017;14(7):434-52.

39. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012*. **Neuro Oncol**. 2015;17 Suppl 4(suppl 4):iv1-iv62.
40. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. **N Engl J Med**. 2005;352(10):987-96.
41. Molenaar RJ, Botman D, Smits MA, Hira VV, van Lith SA, Stap J, et al. *Radioprotection of IDH1-Mutated Cancer Cells by the IDH1-Mutant Inhibitor AGI-5198*. **Cancer Res**. 2015;75(22):4790-802.
42. van den Bent MJ, Baumert B, Erridge SC, Vogelbaum MA, Nowak AK, Sanson M, et al. *Interim results from the CATNON trial (EORTC study 26053-22054) of treatment with concurrent and adjuvant temozolomide for 1p/19q non-co-deleted anaplastic glioma: a phase 3, randomised, open-label intergroup study*. **The Lancet**. 2017;390(10103):1645-53.
43. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. **Lancet Oncol**. 2009;10(5):459-66.
44. Nagasawa DT, Chow F, Yew A, Kim W, Cremer N, Yang I. *Temozolomide and other potential agents for the treatment of glioblastoma multiforme*. **Neurosurg Clin N Am**. 2012;23(2):307-22, ix.
45. Fink D, Aebi S, Howell SB. *The role of DNA mismatch repair in drug resistance*. **Clin Cancer Res**. 1998;4(1):1-6.
46. Omuro AD, L. M. *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review*. **JAMA**. 2013;310(17):1842-50.
47. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, et al. *Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma*. **Cancer Cell**. 2012;22(4):425-37.
48. Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, et al. *O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells*. **J Neurochem**. 2006;96(3):766-76.
49. Kleihues P. *Pathology and genetics of tumors of the nervous system*. **Lyons: IARC Press**. 2000.

50. Parsons DW, Li M, Zhang X, Jones S, Leary RJ, Lin JC, et al. *The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma*. **Science**. 2011;331(6016):435-9.
51. Bax DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, Viana-Pereira M, et al. *Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development*. **PLoS One**. 2009;4(4):e5209.
52. Abrahao-Machado LF, Antunes B, Filippi RZ, Volc S, Boldrini E, Menezes WP, et al. *Loss of MTAP expression is a negative prognostic marker in Ewing sarcoma family of tumors*. **Biomark Med**. 2018;12(1):35-44.
53. Jones DTW, Kieran MW, Bouffet E, Alexandrescu S, Bandopadhyay P, Bornhorst M, et al. *Pediatric low-grade gliomas: next biologically driven steps*. **Neuro Oncol**. 2018;20(2):160-73.
54. Collins VP, Jones DT, Giannini C. *Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. **Acta Neuropathol**. 2015;129(6):775-88.
55. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, et al. *BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas*. **J Clin Invest**. 2008;118(5):1739-49.
56. Becker AP, Scapulatempo-Neto C, Carloni AC, Paulino A, Sheren J, Aisner DL, et al. *KIAA1549: BRAF Gene Fusion and FGFR1 Hotspot Mutations Are Prognostic Factors in Pilocytic Astrocytomas*. **J Neuropathol Exp Neurol**. 2015;74(7):743-54.
57. Vaubel RA, Caron AA, Yamada S, Decker PA, Eckel Passow JE, Rodriguez FJ, et al. *Recurrent copy number alterations in low-grade and anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma with and without BRAF V600E mutation*. **Brain Pathol**. 2018;28(2):172-82.
58. Zhang J, Wu G, Miller CP, Tatevossian RG, Dalton JD, Tang B, et al. *Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas*. **Nature Genetics**. 2013;45(6):602-12.
59. Velázquez Vega JE, Brat DJ. *Molecular-Genetic Classification of Gliomas and Its Practical Application to Diagnostic Neuropathology*. 2017:73-100.
60. Zacher A, Kaulich K, Stepanow S, Wolter M, Kohrer K, Felsberg J, et al. *Molecular Diagnostics of Gliomas Using Next Generation Sequencing of a Glioma-Tailored Gene Panel*. **Brain Pathol**. 2017;27(2):146-59.

61. Aldape K, Pfister SM. *Next-generation molecular diagnostics*. 2016;134:121-30.
62. Waitkus MS, DiPas BH, Yan H. *Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas*. **Neuro Oncol**. 2016;18(1):16-26.
63. Shirahata M, Ono T, Stichel D, Schrimpf D, Reuss DE, Sahm F, et al. *Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas*. **Acta Neuropathol**. 2018;136(1):153-66.
64. Wang PF, Liu N, Song HW, Yao K, Jiang T, Li SW, et al. *IDH-1R132H mutation status in diffuse glioma patients: implications for classification*. **Oncotarget**. 2016;7(21):31393-400.
65. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, et al. *Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas*. **J Natl Cancer Inst**. 1998;90(19):1473-9.
66. Wesseling P, van den Bent M, Perry A. *Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers*. **Acta Neuropathol**. 2015;129(6):809-27.
67. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. *A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma*. **Cancer Res**. 2006;66(20):9852-61.
68. Dubbink HJ, Atmodimedjo PN, Kros JM, French PJ, Sanson M, Idbaih A, et al. *Molecular classification of anaplastic oligodendroglioma using next-generation sequencing: a report of the prospective randomized EORTC Brain Tumor Group 26951 phase III trial*. **Neuro-Oncology**. 2016;18(3):388-400.
69. Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, et al. *Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402*. **J Clin Oncol**. 2013;31(3):337-43.
70. Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, et al. *Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma*. **Science**. 2011;333(6048):1453-5.
71. GP D, OC A, DP. C. *From genomics to the clinic: biological and translational insights of mutant IDH 1/2 in glioma*. **Neurosurg Focus**. 2013;34(2).

72. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Backlund LM, Chan R, Jones DT, et al. *IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas*. **Neuro Oncol**. 2009;11(4):341-7.
73. Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamowicz-Brice M, Zhang J, et al. *Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease*. **J Clin Oncol**. 2010;28(18):3061-8.
74. Malta TM, de Souza CF, Sabedot TS, Silva TC, Mosella MS, Kalkanis SN, et al. *Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): biological and clinical implications*. **Neuro Oncol**. 2018;20(5):608-20.
75. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. *Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance*. **Neurotherapeutics**. 2017;14:284-97.
76. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. **Acta Neuropathol**. 2007;114(2):97-109.
77. Hadjipanayis CG, Van Meir EG. *Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies*. **Trends Mol Med**. 2009;15(11):519-30.
78. Ohgaki H, Kleihues P. *The definition of primary and secondary glioblastoma*. **Clin Cancer Res**. 2013;19(4):764-72.
79. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. **N Engl J Med**. 2009;360(8):765-73.
80. Tateishi K, Yamamoto T. *IDH-Mutant Gliomas*. 2019.
81. Thompson CB. *Metabolic enzymes as oncogenes or tumor suppressors*. **N Engl J Med**. 2009;360(8):813-5.
82. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN. *CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated*. **Cancer Res**. 1996;56(1):150-3.
83. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. **Cell**. 2013;155(2):462-77.

84. Jungk C, Mock A, Exner J, Geisenberger C, Warta R, Capper D, et al. *Spatial transcriptome analysis reveals Notch pathway-associated prognostic markers in IDH1 wild-type glioblastoma involving the subventricular zone.* **BMC Med.** 2016;14(1):170.
85. BJ G, DJ P, HR M, H G, L L, A S, et al. *MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma.* **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 2014;111(34).
86. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. *Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment.* **Cancer Cell.** 2017;32(1):42-56 e6.
87. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. *Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma.* **Cancer Cell.** 2010;17(5):510-22.
88. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1.* **Cancer Cell.** 2010;17(1):98-110.
89. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, et al. *IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype.* **Nature.** 2012;483(7390):479-83.
90. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. *Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma.* **Cell.** 2016;164(3):550-63.
91. TC A, MD E, SE E. *The structure of human 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase at 1.7 Å resolution provides insights into substrate binding and catalysis.* **Structure.** 1999;7(6):629-41.
92. Bertino JR, Waud WR, Parker WB, Lubin M. *Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity: current strategies.* **Cancer Biol Ther.** 2011;11(7):627-32.
93. Mora J, Alaminos M, de Torres C, Illei P, Qin J, Cheung NK, et al. *Comprehensive analysis of the 9p21 region in neuroblastoma suggests a role for genes mapping to 9p21-23 in the biology of favourable stage 4 tumours.* **Br J Cancer.** 2004;91(6):1112-8.
94. Savarese TM, Crabtree GW, Parks RE. *5'-methylthioadenosine phosphorylase—I.* **Biochemical Pharmacology.** 1981;30(3):189-99.

95. Kirovski G, Stevens AP, Czech B, Dettmer K, Weiss TS, Wild P, et al. *Down-regulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) induces progression of hepatocellular carcinoma via accumulation of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA)*. **Am J Pathol**. 2011;178(3):1145-52.
96. Casero RA, Jr., Murray Stewart T, Pegg AE. *Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities*. **Nat Rev Cancer**. 2018;18(11):681-95.
97. Olopade OI, Pomykala HM, Hagos F, Sveen LW, Espinosa R, 3rd, Dreyling MH, et al. *Construction of a 2.8-megabase yeast artificial chromosome contig and cloning of the human methylthioadenosine phosphorylase gene from the tumor suppressor region on 9p21*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995;92(14):6489-93.
98. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, et al. *A draft map of the human proteome*. **Nature**. 2014;509(7502):575-81.
99. Traweek ST, Riscoe MK, Ferro AJ, Braziel RM, Magenis RE, Fitch JH. *Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in acute leukemia: pathologic, cytogenetic, and clinical features*. **Blood**. 1988;71(6):1568-73.
100. Batova A, Diccianni MB, Nobori T, Vu T, Yu J, Bridgeman L, et al. *Frequent deletion in the methylthioadenosine phosphorylase gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: strategies for enzyme-targeted therapy*. **Blood**. 1996;88(8):3083-90.
101. Kinoshita Y, Hida T, Hamasaki M, Matsumoto S, Sato A, Tsujimura T, et al. *A combination of MTAP and BAP1 immunohistochemistry in pleural effusion cytology for the diagnosis of mesothelioma*. **Cancer Cytopathol**. 2018;126(1):54-63.
102. Stadler WM, Olopade OI. *The 9p21 region in bladder cancer cell lines: large homozygous deletion inactivate the CDKN2, CDKN2B and MTAP genes*. **Urol Res**. 1996;24(4):239-44.
103. Della Ragione F, Russo G, Oliva A, Mastropietro S, Mancini A, Borrelli A, et al. *5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase and p16INK4 deficiency in multiple tumor cell lines*. **Oncogene**. 1995;10(5):827-33.
104. Lubin M, Lubin A. *Selective killing of tumors deficient in methylthioadenosine phosphorylase: a novel strategy*. **PLoS One**. 2009;4(5):e5735.

105. Woollard WJ, Kalaivani NP, Jones CL, Roper C, Tung L, Lee JJ, et al. *Independent Loss of Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) in Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma*. **J Invest Dermatol**. 2016;136(6):1238-46.
106. Kadariya Y, Yin B, Tang B, Shinton SA, Quinlivan EP, Hua X, et al. *Mice heterozygous for germ-line mutations in methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) die prematurely of T-cell lymphoma*. **Cancer Res**. 2009;69(14):5961-9.
107. Subhi AL, Tang B, Balsara BR, Altomare DA, Testa JR, Cooper HS, et al. *Loss of methylthioadenosine phosphorylase and elevated ornithine decarboxylase is common in pancreatic cancer*. **Clin Cancer Res**. 2004;10(21):7290-6.
108. Li CF, Fang FM, Kung HJ, Chen LT, Wang JW, Tsai JW, et al. *Downregulated MTAP expression in myxofibrosarcoma: A characterization of inactivating mechanisms, tumor suppressive function, and therapeutic relevance*. **Oncotarget**. 2014;5(22):11428-41.
109. Leal M, Lima E, Silva P, Assumpcao P, Calcagno D, Payao S, et al. *Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil*. **World J Gastroenterol**. 2007;13(18):2568-74.
110. Huang HY, Li SH, Yu SC, Chou FF, Tzeng CC, Hu TH, et al. *Homozygous deletion of MTAP gene as a poor prognosticator in gastrointestinal stromal tumors*. **Clin Cancer Res**. 2009;15(22):6963-72.
111. Tedeschi PM, Kathari YK, Johnson-Farley N, Bertino JR. *Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP)-deficient T-cell ALL xenografts are sensitive to pralatrexate and 6-thioguanine alone and in combination*. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2015;75(6):1247-52.
112. Hellerbrand C, Muhlbauer M, Wallner S, Schuierer M, Behrmann I, Bataille F, et al. *Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma*. **Carcinogenesis**. 2006;27(1):64-72.
113. Hori Y, Hori H, Yamada Y, Carrera CJ, Tomonaga M, Kamihira S, et al. *The methylthioadenosine phosphorylase gene is frequently co-deleted with the p16INK4a gene in acute type adult T-cell leukemia*. **Int J Cancer**. 1998;75(1):51-6.
114. O'Brien TG, Megosh LC, Gilliard G, Soler AP. *Ornithine Decarboxylase Overexpression Is a Sufficient Condition for Tumor Promotion in Mouse Skin*. **Cancer Res**. 1997;57(13): 2630-7.

115. Subhi AL, Diegelman P, Porter CW, Tang B, Lu ZJ, Markham GD, et al. *Methylthioadenosine phosphorylase regulates ornithine decarboxylase by production of downstream metabolites*. **J Biol Chem**. 2003;278(50):49868-73.
116. Chaturvedi S, Hoffman RM, Bertino JR. *Exploiting methionine restriction for cancer treatment*. **Biochem Pharmacol**. 2018;154:170-3.
117. Crespo I, Tao H, Nieto AB, Rebelo O, Domingues P, Vital AL, et al. *Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: impact on gene expression levels*. **PLoS One**. 2012;7(9):e46088.
118. Crespo I, Vital AL, Nieto AB, Rebelo O, Tao H, Lopes MC, et al. *Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays*. **J Mol Diagn**. 2011;13(6):634-47.
119. Becker AP, Scapulatempo-Neto C, Menezes WP, Clara C, Machado HR, Oliveira RS, et al. *Expression of Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) in Pilocytic Astrocytomas*. **Pathobiology**. 2015;82(2):84-9.
120. Bidinotto LT, Torrieri R, Mackay A, Almeida GC, Viana-Pereira M, Cruvinel-Carlioni A, et al. *Copy Number Profiling of Brazilian Astrocytomas*. **G3 (Bethesda)**. 2016;6(7):1867-78.
121. Frazao L, do Carmo Martins M, Nunes VM, Pimentel J, Faria C, Miguens J, et al. *BRAF V600E mutation and 9p21: CDKN2A/B and MTAP co-deletions - Markers in the clinical stratification of pediatric gliomas*. **BMC Cancer**. 2018;18(1):1259.
122. Christopher SA, Diegelman P, Porter CW, Kruger WD. *Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line*. **Cancer Res**. 2002;62(22):6639-44.
123. Li W SD, Mizobuchi H, Martin DS, Gu B, Gorlick R, et al. *Status of methylthioadenosine phosphorylase and its impact on cellular response to L-alanosine and methylmercaptapurine riboside in human soft tissue sarcoma cells*. **Oncol Res**. 2004(14):373-9.
124. Chen ZH OO, Savarese TM. . *Expression of methylthioadenosine phosphorylase cDNA in p16-, MTAP-malignant cells: restoration of methylthioadenosine phosphorylase-dependent salvage pathways and sensitivity to inhibitors of purine de novo synthesis*. **Mol Pharmacol**. 1997(52):903-11.
125. Munshi PN, Lubin M, Bertino JR. *6-thioguanine: a drug with unrealized potential for cancer therapy*. **Oncologist**. 2014;19(7):760-5.

126. Tang B, Kadariya Y, Chen Y, Slifker M, Kruger WD. *Expression of MTAP inhibits tumor-related phenotypes in HT1080 cells via a mechanism unrelated to its enzymatic function*. **G3 (Bethesda)**. 2014;5(1):35-44.
127. Simile MM BS, Angioni E, Carta G, De Miglio MR, Muroli MR, et al. . *5'-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication*. **J Hepatol**. 2001(34):386-94.
128. 5753213. MEUp. *Pharmaceutical compositions containing 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine S-adenosylmethionine and their salts for reducing seborrhea*. 1998.
129. Tang B, Lee HO, An SS, Cai KQ, Kruger WD. *Specific Targeting of MTAP-Deleted Tumors with a Combination of 2'-Fluoroadenine and 5'-Methylthioadenosine*. **Cancer Res**. 2018;78(15):4386-95.
130. Stopa N, Krebs JE, Shechter D. *The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond*. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2015;72(11):2041-59.
131. Mavrakis KJ, McDonald ER, 3rd, Schlabach MR, Billy E, Hoffman GR, deWeck A, et al. *Disordered methionine metabolism in MTAP/CDKN2A-deleted cancers leads to dependence on PRMT5*. **Science**. 2016;351(6278):1208-13.
132. Marjon K, Cameron MJ, Quang P, Clasquin MF, Mandley E, Kunii K, et al. *MTAP Deletions in Cancer Create Vulnerability to Targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 Axis*. **Cell Rep**. 2016;15(3):574-87.
133. Gaia Bistulfi, Gillard, Morrison C, Affronti HC, Mohler J, Foster BA, et al. *The essential role of methylthioadenosine phosphorylase in prostate cancer*. **Oncotarget**. 2016;7(12).
134. Wan Y-W, Allen GI, Liu Z. *TCGA2STAT: simple TCGA data access for integrated statistical analysis in R*. **Bioinformatics**. 2016;32(6):952-4.
135. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, et al. *Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma*. **J Clin Oncol**. 2008;26(18):3015-24.
136. Yamanaka R, Arao T, Yajima N, Tsuchiya N, Homma J, Tanaka R, et al. *Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients*. **Oncogene**. 2006;25(44):5994-6002.

137. Catherine L. Nutt DRM, Rebecca A. Betensky, Pablo Tamayo, J. Gregory Cairncross, Christine Ladd, Ute Pohl, Christian Hartmann, Margaret E. McLaughlin, Tracy T. Batchelor, Peter M. Black, Andreas von Deimling, Scott L. Pomeroy, Todd R. Golub, and David N. Louis. *Gene Expression-based Classification of Malignant Gliomas Correlates Better with Survival than Histological Classification*. **Cancer Res.** 2003;63:1602–7.
138. Heidi S. Phillips, * Samir Kharbanda,1 Ruihuan Chen,1 William F. Forrest,2 Robert H. Soriano,3 Thomas D. Wu,4 Anjan Misra,5 Janice M. Nigro,5 Howard Colman,6 Liliana Soroceanu,1 P. Mickey Williams,3 Zora Modrusan,3 Burt G. Feuerstein,5 and Ken Aldape7. *Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis*. **CANCER CELL.** 2006;9.
139. Cruvinel-Carloni A, Silva-Oliveira R, Torrieri R, Bidinotto LT, Berardinelli GN, Oliveira-Silva VA, et al. *Molecular characterization of short-term primary cultures and comparison with corresponding tumor tissue of Brazilian glioblastoma patients*. **Translational Cancer Research.** 2017;6(2):332-45.
140. Simms D, Paul, E., Cizdziel, Piotr,, C.N. *Trizol: A new reagent for optimal single step of RNA*. **Focus** 1993;15(4):532-5.
141. Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA. *Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data*. **Bioinformatics.** 2012;28(4):464-9.
142. Merks RMH, Geissmann Q. *OpenCFU, a New Free and Open-Source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects*. **PLoS ONE.** 2013;8(2):e54072.
143. Corp I. *IBM SPSS Statistics for Windows*. 20 ed. **Armonk, NY** 2011.
144. Motulsky H, Christopoulos A. *Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression. A Practical Guide to Curve Fitting*. **New York: Oxford University Press;** 2004.
145. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. *The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability*. **Methods Mol Biol.** 2011;740:33-43.
146. Zhao M, Zhao Z. *Concordance of copy number loss and down-regulation of tumor suppressor genes: a pan-cancer study*. **BMC Genomics.** 2016;17 Suppl 7:532.

147. Zhang H, Chen ZH, Savarese TM. *Codeletion of the genes for p16INK4, methylthioadenosine phosphorylase, interferon-alpha1, interferon-beta1, and other 9p21 markers in human malignant cell lines.* **Cancer Genet Cytogenet.** 1996;86(1):22-8.
148. Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. *Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas.* **Clin Cancer Res.** 2003;9(6):2108-13.
149. Lopez F, Sampedro T, Llorente JL, Hermsen M, Alvarez-Marcos C. *Alterations of p14 (ARF), p15 (INK4b), and p16 (INK4a) Genes in Primary Laryngeal Squamous Cell Carcinoma.* **Pathol Oncol Res.** 2017;23(1):63-71.
150. Krasinskas AM, Bartlett DL, Cieply K, Dacic S. *CDKN2A and MTAP deletions in peritoneal mesotheliomas are correlated with loss of p16 protein expression and poor survival.* **Mod Pathol.** 2010;23(4):531-8.
151. Hansen LJ, Sun R, Yang R, Singh SX, Chen LH, Pirozzi CJ, et al. *MTAP Loss Promotes Stemness in Glioblastoma and Confers Unique Susceptibility to Purine Starvation.* **Cancer Res.** 2019;79(13):3383-94.
152. Sturm D, Bender S, Jones DT, Lichter P, Grill J, Becher O, et al. *Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge.* **Nat Rev Cancer.** 2014;14(2):92-107.
153. Suzuki T, Maruno M, Wada K, Kagawa N, Fujimoto Y, Hashimoto N, et al. *Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system.* **Brain Tumor Pathology.** 2004;21(1):27-34.
154. Olopade OI, Jenkins RB, Ransom DT, Malik K, Pomykala H, Nobori T, et al. *Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas.* **Cancer Res.** 1992;52(9):2523-9.
155. Vivanco I, Sawyers CL. *The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer.* **Nature Reviews Cancer.** 2002;2(7):489-501.
156. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.* **Endocr Rev.** 2001;22(2):153-83.
157. Rubinfeld H, Seger R. *The ERK Cascade: A Prototype of MAPK Signaling.* **Molecular Biotechnology.** 2005;31(2):151-74.

158. Sun Y, Zhao C, Ye Y, Wang Z, He Y, Li Y, et al. *High expression of fibronectin 1 indicates poor prognosis in gastric cancer.* **Oncol Lett.** 2020;19(1):93-102.
159. Zhou X, Hao Q, Liao P, Luo S, Zhang M, Hu G, et al. *Nerve growth factor receptor negates the tumor suppressor p53 as a feedback regulator.* **Elife.** 2016;5.
160. Daubon T, Leon C, Clarke K, Andrique L, Salabert L, Darbo E, et al. *Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development.* **Nat Commun.** 2019;10(1):1146.
161. Wang J DL, Huang J, Cai R, Zhu X, Liu F, Wang Q, Zhang J, Zheng Y. *High expression of Fibronectin 1 suppresses apoptosis through the NF- κ B pathway and is associated with migration in nasopharyngeal carcinoma.* **Am J Transl Res** 2017;9(10):4502-11.
162. Zhang Z, Fang C, Wang Y, Zhang J, Yu J, Zhang Y, et al. *COL1A1: A potential therapeutic target for colorectal cancer expressing wild-type or mutant KRAS.* **Int J Oncol.** 2018;53(5):1869-80.
163. de Miguel D, Lemke J, Anel A, Walczak H, Martinez-Lostao L. *Onto better TRAILs for cancer treatment.* **Cell Death Differ.** 2016;23(5):733-47.
164. Knight MJ, Riffkin CD, Muscat AM, Ashley DM, Hawkins CJ. *Analysis of FasL and TRAIL induced apoptosis pathways in glioma cells.* **Oncogene.** 2001;20(41):5789-98.
165. Kirkpatrick CA, Selleck SB. *Heparan sulfate proteoglycans at a glance.* **Journal of Cell Science.** 2007;120(11):1829-32.
166. Kaur SP, Cummings BS. *Role of glypicans in regulation of the tumor microenvironment and cancer progression.* **Biochem Pharmacol.** 2019;168:108-18.
167. Kawakami K, Kawakami M, Snoy PJ, Husain SR, Puri RK. *In vivo overexpression of IL-13 receptor alpha2 chain inhibits tumorigenicity of human breast and pancreatic tumors in immunodeficient mice.* **J Exp Med.** 2001;194(12):1743-54.
168. Fujisawa T, Joshi BH, Puri RK. *IL-13 regulates cancer invasion and metastasis through IL-13Ralpha2 via ERK/AP-1 pathway in mouse model of human ovarian cancer.* **Int J Cancer.** 2012;131(2):344-56.
169. Bistulfi G, Affronti HC, Foster BA, Karasik E, Gillard B, Morrison C, et al. *The essential role of methylthioadenosine phosphorylase in prostate cancer.* **Oncotarget.** 2016;7(12):14380-93.

170. Tang B, Testa JR, Kruger WD. *Increasing the therapeutic index of 5-fluorouracil and 6-thioguanine by targeting loss of MTAP in tumor cells.* **Cancer Biol Ther.** 2012;13(11):1082-90.
171. Andreu-Perez P, Hernandez-Losa J, Moline T, Gil R, Grueso J, Pujol A, et al. *Methylthioadenosine (MTA) inhibits melanoma cell proliferation and in vivo tumor growth.* **BMC Cancer.** 2010;10:265.
172. Li TW, Zhang Q, Oh P, Xia M, Chen H, Bermanian S, et al. *S-Adenosylmethionine and methylthioadenosine inhibit cellular FLICE inhibitory protein expression and induce apoptosis in colon cancer cells.* **Mol Pharmacol.** 2009;76(1):192-200.
173. Liu W, Lv G, Li Y, Li L, Wang B. *Downregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in malignant gliomas.* **J Exp Clin Cancer Res.** 2011;30:76.
174. Melendez B, Garcia-Claver A, Ruano Y, Campos-Martin Y, de Lope AR, Perez-Magan E, et al. *Copy Number Alterations in Glioma Cell Lines.* 2011.
175. Johanns TM, Fu Y, Kobayashi DK, Mei Y, Dunn IF, Mao DD, et al. *High incidence of TERT mutation in brain tumor cell lines.* **Brain Tumor Pathol.** 2016;33(3):222-7.

ANEXOS

Anexo A – Ficha individual para coleta de dados clínico-patológicos

| CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DE GLIOMAS | | | |
|--|--|---|---------------|
| 11 | Identificação | 1 | |
| 22 | Nome (Iniciais) | 2 | |
| 33 | Registro hospitalar (RH) | 3 | |
| 44 | Data de nascimento DD/MM/AAAA | 4 | ___/___/_____ |
| 55 | Sexo 1- Feminino; 2- Masculino | 5 | |
| 66 | Cor 1- Branco; 2- Pardo; 3- Negro; 99- Ignorado | 6 | |
| 77 | Cidade em que nasceu Descrever; 99- Ignorado | 7 | |
| 88 | Estado em que nasceu Descrever; 99- Ignorado | 8 | |
| 99 | Tabagista 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado | 9 | |
| 110 | Etilista 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado | 1 | |
| DADOS CLÍNICOS | | | |
| 111 | Data do diagnóstico no HCB DD/MM/AAAA | 1 | ___/___/_____ |
| 112 | Tipo histológico 1- Astrocitoma; 2- Oligodendroglioma; 3- Misto; 4- Ependimoma; 5- Outros; 99- Ignorado | 1 | |
| 113 | Subtipo histológico Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 1 | |
| 114 | Grau de malignidade 1- I; 2- II; 3- III; 4- IV; 99- Ignorado | 1 | |
| 115 | KPS | 1 | |

| | | | |
|---------------------|---|---|---------------|
| 116 | Descrever; 99- Ignorado Tumor primário (em outro local - sem ser esse tumor) 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado | 1 | |
| 117 | Localização do tumor primário Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 1 | |
| 118 | Localização do tumor (1) 1- Frontal; 2- Parietal; 3- Temporal; 4- Occipital; 5- Insular; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 1 | |
| 119 | Localização do tumor (2) 1- Frontal; 2- Parietal; 3- Temporal; 4- Occipital; 5- Insular; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 1 | |
| 220 | Localização do tumor (3) 1- Frontal; 2- Parietal; 3- Temporal; 4- Occipital; 5- Insular; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 2 | |
| 221 | Lateralidade do tumor 1- Direito; 2- Esquerda; 3- Ambos; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 2 | |
| CIRURGIA | | | |
| 222 | Realizou quantas cirurgias? Número; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 2 | |
| 1ª CIRURGIA | | | |
| 223 | Data da ressecção DD/MM/AAAA | 2 | ___/___/_____ |
| 224 | Tipo de ressecção 1- Biópsia; 2- Craniotomia; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 2 | |
| 225 | Craniotomia 1- Completa; 2- Parcial; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 2 | |
| 226 | Número de DNA 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 2 | |
| 227 | Número histológico (E) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 2 | |
| 228 | Número histológico (I) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 2 | |
| 229 | Número histológico (R) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 2 | |
| RADIOTERAPIA | | | |
| 330 | Radioterapia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado | 3 | |

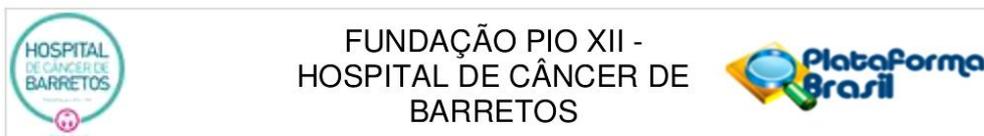
| | | | |
|----------------------|---|---|---------------|
| 331 | Quantas sessões realizou? Número; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 3 | |
| 332 | Data de início da radioterapia DD/MM/AAAA | 3 | ___/___/_____ |
| 333 | Data de término da radioterapia DD/MM/AAAA | 3 | ___/___/_____ |
| QUIMIOTERAPIA | | | |
| 334 | Quimioterapia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado | 3 | |
| 335 | Data de início da quimioterapia DD/MM/AAAA | 3 | ___/___/_____ |
| 336 | Quimioterápico 1- Temozolamida; 2- Carmustina; 3- Outro; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 3 | |
| 337 | Se outro quimioterápico, detalhar: Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 3 | |
| 338 | Dose do quimioterápico Em mg; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 3 | |
| 339 | Quantas sessões realizou? Número; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 3 | |
| 440 | Intervalo entre doses Em dias; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 4 | |
| 441 | Data de término da quimioterapia DD/MM/AAAA | 4 | ___/___/_____ |
| 2ª CIRURGIA | | | |
| 442 | Data da ressecção DD/MM/AAAA | 4 | ___/___/_____ |
| 443 | Tipo de ressecção 1- Biópsia; 2- Craniotomia; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 4 | |
| 444 | Craniotomia 1- Completa; 2- Parcial; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 4 | |
| 445 | Número de DNA 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 4 | |
| 446 | Número histológico (E) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 4 | |
| 447 | Número histológico (I) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 7 | |

| | | | |
|--------------------|--|--------|---------------|
| 448 | Número histológico (R) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 4 | |
| 3ª CIRURGIA | | | |
| 449 | Data da ressecção DD/MM/AAAA | 9 | ___/___/_____ |
| 550 | Tipo de ressecção 1- Biópsia; 2- Craniotomia; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 5 | |
| 551 | Craniotomia 1- Completa; 2- Parcial; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 1 | |
| 552 | Número de DNA 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 5 2 | |
| 553 | Número histológico (E) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 5 3 | |
| 554 | Número histológico (I) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 5 4 | |
| 555 | Número histológico (R) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 5 5 | |
| RECIDIVA | | | |
| 556 | Recidiva 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado | 5 6 | |
| 557 | Data do diagnóstico da recidiva DD/MM/AAAA | 5 7 | ___/___/_____ |
| 558 | Localização do tumor (1) 1- Frontal; 2- Parietal; 3-temporal; 4-occipital; 5- Insular; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 5 8 | |
| 559 | Localização do tumor (2) 1- Frontal; 2- Parietal; 3-temporal; 4-occipital; 5- Insular; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 5 9 | |
| 660 | Localização do tumor (3) 1- Frontal; 2- Parietal; 3-temporal; 4-occipital; 5- Insular; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 6 0 | |
| 661 | Lateralidade do tumor 1- Direito; 2- Esquerda; 3- Ambos; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 6 1 | |
| 662 | Data da ressecção da recidiva DD/MM/AAAA | 6 2 | ___/___/_____ |
| 663 | Tipo de ressecção da recidiva 1- Biópsia; 2- Crâniotomia; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 6 3 | |

| | | | |
|-----|---|--------|---------------|
| 664 | Craniotomia da recidiva 1- Completa; 2- Parcial; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 6 4 | |
| 665 | Número de DNA da recidiva 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 6 5 | |
| 666 | Número histológico da recidiva 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 6 6 | |
| 667 | Número histológico (E) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 6 7 | |
| 668 | Número histológico (I) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 6 8 | |
| 669 | Número histológico (R) 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 6 9 | |
| 770 | Tipo histológico da recidiva 1- Astrocitoma; 2- Oligodendroglioma; 3- Misto; 4- Ependinoma; 5- Outros; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 7 0 | |
| 771 | Subtipo histológico da recidiva Descritivo; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 7 1 | |
| 772 | Grau de malignidade da recidiva 1- I; 2- II; 3- III; 4- IV; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 7 2 | |
| 773 | Radioterapia da recidiva 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 7 3 | |
| 774 | Data de início da radioterapia da recidiva DD/MM/AAAA | 7 4 | ___/___/_____ |
| 775 | Data de término da radioterapia da recidiva DD/MM/AAAA | 7 5 | ___/___/_____ |
| 776 | Quimioterapia da recidiva 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 7 6 | |
| 777 | Data de início da quimioterapia da recidiva DD/MM/AAAA | 7 7 | ___/___/_____ |
| 778 | Quimioterápico 1- Temozolamida; 2- Carmustina; 3- Outro; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 8 | |
| 779 | Se outro quimioterápico, detalhar: Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 9 | |
| 880 | Dose do quimioterápico da recidiva Em mg; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 0 | |
| 881 | Intervalo entre doses da recidiva Em dias; 88- Não se aplica; 99- Ignorado | 1 | |

| | | | |
|-----|---|---|---------------|
| 882 | Data de término da quimioterapia da recidiva DD/MM/AAAA | 2 | ___/___/_____ |
| 883 | Status 1- Vivo sem doença; 2- Vivo com doença; 3- Óbito por câncer; 4- Óbito por outras causas; 5- Perda de seguimento; 99- Ignorado | 3 | |
| 884 | Data do óbito DD/MM/AAAA | | ___/___/_____ |
| 885 | Data da última informação DD/MM/AAAA | 5 | ___/___/_____ |
| 886 | Isoforma 0- Nenhuma; 1- 100% GNNK+; 2- 100% GNNK-; 3- 75% GNNK+; 4- 75% GNNK-; 5- 50%; 6- Material insuficiente; 99- Ignorado | 6 | |

Anexo B – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização molecular de MTAP (Methylthioadenosine phosphorylase) e avaliação do seu potencial terapêutico em gliomas

Pesquisador: Weder Pereira de Menezes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46422815.9.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.175.879

Data da Relatoria: 25/07/2015

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, e após a análise das respostas as pendências emitidas, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 04/02/2016.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 961/2015.

BARRETOS, 07 de Agosto de 2015

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

Anexo C – Alterações moleculares em linhagens celulares de glioma

| Linhagem celular | Mutação | | | | Deleção 9p21 | Expressão Proteica |
|------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | IDH1 | ATRX | TP53 | TERT | CDKN2A | MTAP |
| A172 | Ausência ^g | Ausência ^g | Ausência ^g | C228T ^f | Presença ^{c,e} | Ausência ^h |
| T98G | Ausência ^g | Ausência ^g | Presença ^g | C250T ^f | Presença , ^e | Presença ^h |
| SW1088 | Ausência ^g | Presença ^g | Presença ^g | C250T | Presença ^{c,e} | Ausência ^h |
| SW1783 | Ausência ^g | Ausência ^g | Presença ^g | C228T | Ausente ^e | Presença ^h |
| U87MG | Ausência ^g | Presença ^g | Ausência ^g | C228T | Presença ^{b,e} | Ausência ^h |
| GAMG | Ausência ^g | Ausência ^g | Ausência ^g | C228T | NA | Presença ^h |
| U251MG | Ausência ^g | Presença ^g | Presença ^g | C228T | Ausente ^b | Presença ^h |
| UW479 | Ausência ^g | Ausência ^g | Presença ^g | Ausência | Presença , ^d | Ausência ^h |
| KNS42 | Ausência ^g | Ausência ^g | Presença ^g | C250T | Presença , ^d | Presença ^h |
| RES259 | Ausência ^g | Presença ^g | Presença ^g | C228T | Ausência, ^d | Presença ^h |
| SF188 | Ausência ^g | Ausência ^g | Presença ^g | Ausência | Ausência, ^d | Presença ^h |
| NHA* | Ausência ^g | Ausência ^g | Ausência ^g | Ausência | Ausência | Presença ^h |

a: Dados obtidos de acordo com Ichimura et al.^{72, 119}; b: Dados obtidos de acordo com Liu et al.¹⁷³, c: Dados obtidos de acordo com o fabricante ATCC®; d: Dados obtidos de acordo com Bax et al.⁵¹. e: Dados obtidos de acordo com Melendez et al.¹⁷⁴; f: Dados obtidos de acordo com Johans et al.¹⁷⁵ g: Dados obtidos por NGS (Anexo G) h: Dados obtidos por western blotting
 NA: Não avaliado. NHA: Linhagem de astrócito normal humano utilizado como controle.

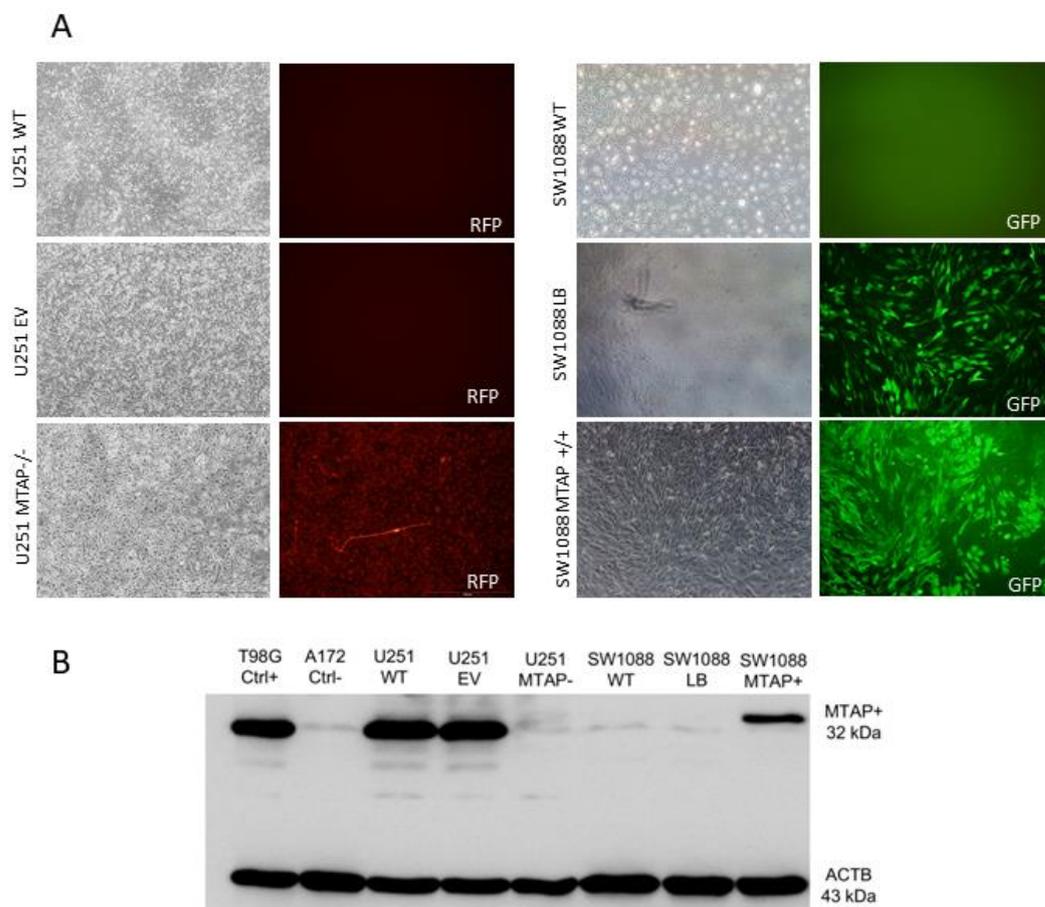
Anexo D – Alterações genômicas das linhagens celulares de glioma

| Amostra | Grau Histológico | Gene | Alteração | Alteração proteica | Alteração genômica |
|---------|------------------|--------|-----------------|--------------------|--------------------|
| KNS42 | IV | H3F3A | Missense_Mut. | p.Gly35Val | c.104G>T |
| KNS42 | IV | NF1 | Frame_Shift_Del | p.Pro678fs | c.2033delC |
| KNS42 | IV | SETD2 | Missense_Mut. | p.Arg2121His | c.6362G>A |
| KNS42 | IV | TP53 | Nonsense_Mut. | p.Arg342Ter | c.1024C>T |
| U251MG | IV | ATRX | Frame_Shift_Ins | p.Lys994fs | c.2978_2979insA |
| U251MG | IV | NF1 | Missense_Mut. | p.Trp696Arg | c.2086T>C |
| U251MG | IV | PTEN | Frame_Shift_Ins | p.Glu242fs | c.723_724insTT |
| U251MG | IV | TP53 | Missense_Mut. | p.Arg273His | c.818G>A |
| A172 | IV | NF1 | Frame_Shift_Del | p.Pro678fs | c.2033delC |
| A172 | IV | RB1 | Missense_Mut. | p.Val852Leu | c.2554G>C |
| U87MG | IV | ATRX | Missense_Mut. | p.Asn564Ser | c.1691A>G |
| U87MG | IV | NF1 | Frame_Shift_Del | p.Phe1247fs | c.3739_3742delTTTG |
| U87MG | IV | NF1 | Missense_Mut. | p.Lys1444Met | c.4331A>T |
| U87MG | IV | RB1 | Frame_Shift_Ins | p.Asn295fs | c.884_885insAT |
| T98G | IV | SETD2 | Missense_Mut. | p.Lys145Asn | c.435G>T |
| T98G | IV | TP53 | Missense_Mut. | p.Met237Ile | c.711G>A |
| RES259 | II | ATRX | Missense_Mut. | p.Thr951Asn | c.2852C>A |
| RES259 | II | ATRX | Nonsense_Mut. | p.Asn636Lys | c.1907_1908insA |
| RES259 | II | ATRX | Frame_Shift_Ins | p.Ser336fs | c.1006_1007insT |
| RES259 | II | ATRX | Missense_Mut. | p.Pro97Leu | c.290C>T |
| RES259 | II | EGFR | Frame_Shift_Ins | p.Ala1195fs | c.3583_3584insA |
| RES259 | II | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Leu687fs | c.2058_2059insA |
| RES259 | II | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Leu1104fs | c.3309_3310insT |
| RES259 | II | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Ile1284fs | c.3850_3851insA |
| RES259 | II | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Ala2079fs | c.6234_6235insT |
| RES259 | II | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Leu2081fs | c.6242_6243insT |
| RES259 | II | PIK3CA | Frame_Shift_Ins | p.Ser308fs | c.922_923insT |
| RES259 | II | SETD2 | Frame_Shift_Ins | p.Ser2029fs | c.6086_6087insA |
| RES259 | II | SETD2 | Missense_Mut. | p.Gly1621Glu | c.4862G>A |
| RES259 | II | SETD2 | Frame_Shift_Ins | p.Leu695fs | c.2084_2085insT |
| RES259 | II | SETD2 | Missense_Mut. | p.Cys594Gly | c.1780T>G |
| RES259 | II | TP53 | Missense_Mut. | p.Arg273His | c.818G>A |

| | | | | | |
|--------|-----|--------|-----------------|--------------|-----------------------|
| SW1088 | III | ATRX | Missense_Mut. | p.Met2410Val | c.7228A>G |
| SW1088 | III | ATRX | Frame_Shift_Ins | p.Ser2256fs | c.6766_6767insT |
| SW1088 | III | ATRX | Frame_Shift_Ins | p.His1831fs | c.5490_5491insA |
| SW1088 | III | ATRX | Frame_Shift_Ins | p.Ile1533fs | c.4597_4598insA |
| SW1088 | III | ATRX | Missense_Mut. | p.Thr951Asn | c.2852C>A |
| SW1088 | III | ATRX | Frame_Shift_Ins | p.Thr932fs | c.2793_2794insT |
| SW1088 | III | ATRX | Frame_Shift_Ins | p.Ser566fs | c.1696_1697insT |
| SW1088 | III | ATRX | Missense_Mut. | p.Pro97Leu | c.290C>T |
| SW1088 | III | BRAF | Frame_Shift_Ins | p.Leu584fs | c.1749_1750insT |
| SW1088 | III | EGFR | Frame_Shift_Ins | p.Gly930fs | c.2787_2788insA |
| SW1088 | III | KRAS | Frame_Shift_Ins | p.Val29fs | c.84_85insT |
| SW1088 | III | KRAS | Frame_Shift_Ins | p.Met1fs | c.1_2insA |
| SW1088 | III | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Leu687fs | c.2058_2059insA |
| SW1088 | III | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Leu1104fs | c.3309_3310insT |
| SW1088 | III | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Met1111fs | c.3330_3331insT |
| SW1088 | III | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Leu1201fs | c.3602_3603insT |
| SW1088 | III | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Ile1284fs | c.3850_3851insA |
| SW1088 | III | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Ile1618fs | c.4852_4853insA |
| SW1088 | III | NF1 | Missense_Mut. | p.Arg1687Glu | c.5059_5060delAGinsGA |
| SW1088 | III | NF1 | Frame_Shift_Ins | p.Thr2204fs | c.6610_6611insA |
| SW1088 | III | PDGFRA | Missense_Mut. | p.Gly313Val | c.938G>T |
| SW1088 | III | PDGFRA | Frame_Shift_Ins | p.Pro319fs | c.954_955insA |
| SW1088 | III | PIK3CA | Frame_Shift_Ins | p.Thr303fs | c.906_907insT |
| SW1088 | III | PIK3CA | Frame_Shift_Ins | p.Ser308fs | c.922_923insT |
| SW1088 | III | PIK3CA | Missense_Mut. | p.Ile1062Asn | c.3185T>A |
| SW1088 | III | PIK3R1 | Frame_Shift_Ins | p.Tyr463fs | c.1386_1387insA |
| SW1088 | III | SETD2 | Frame_Shift_Ins | p.Ser2470fs | c.7408_7409insA |
| SW1088 | III | SETD2 | Frame_Shift_Ins | p.Thr2338fs | c.7010_7011insT |
| SW1088 | III | SETD2 | Frame_Shift_Ins | p.Ser2029fs | c.6086_6087insA |
| SW1088 | III | SETD2 | Missense_Mut. | p.Gly1621Glu | c.4862G>A |
| SW1088 | III | SETD2 | Frame_Shift_Ins | p.Ile1411fs | c.4231_4232insA |
| SW1088 | III | SETD2 | Frame_Shift_Ins | p.Val1319fs | c.3954_3955insT |
| SW1088 | III | SETD2 | Frame_Shift_Ins | p.Ser1001fs | c.3001_3002insT |
| SW1088 | III | SETD2 | Frame_Shift_Ins | p.Asn811fs | c.2432_2433insA |
| SW1088 | III | SETD2 | Nonsense_Mut. | p.Ser379Ter | c.1134_1135insT |
| SW1088 | III | SETD2 | Frame_Shift_Ins | p.Ile243fs | c.727_728insA |

| | | | | | |
|---------------|-----|--------|---------------|--------------|---------------|
| SW1088 | III | SETD2 | Nonsense_Mut. | p.Lys145Ter | c.432_433insT |
| SW1088 | III | TP53 | Missense_Mut. | p.Asp207Tyr | c.619G>T |
| SW1783 | III | H3F3A | Missense_Mut. | p.Ala16Gly | c.47C>G |
| SW1783 | III | PTEN | Nonsense_Mut. | p.Arg233Ter | c.697C>T |
| SW1783 | III | SETD2 | Missense_Mut. | p.Thr1077Ala | c.3229A>G |
| SW1783 | III | TP53 | Missense_Mut. | p.Arg273His | c.818G>A |
| SW1783 | III | TP53 | Missense_Mut. | p.Arg273Cys | c.817C>T |
| SF188 | IV | SETD2 | Missense_Mut. | p.Tyr2152Cys | c.6455A>G |
| SF188 | IV | TP53 | Missense_Mut. | p.Gly266Glu | c.797G>A |
| UW479 | III | PDGFRA | Missense_Mut. | p.Arg340Gln | c.1019G>A |
| UW479 | III | SETD2 | Missense_Mut. | p.Glu902Gln | c.2704G>C |
| UW479 | III | SETD2 | Missense_Mut. | p.Pro186Leu | c.557C>T |

Anexo E - Estabelecimento das linhagens celulares MTAP^{-/-} (U251) e MTAP^{+/+} (SW1088) pelas tecnologias CRISPR/CAS9 e Lentivírus



A) Análise da atividade de MTAP CRISPR/Cas9 em linhagem U251, demonstrado em campo claro e fluorescência vermelha (RFP). **B)** Análise da ação lentiviral com expressão de MTAP para a linhagem celular SW1088, demonstrado em imagem em campo claro e pela proteína fluorescente verde (GFP). **C)** Análise de western blot confirmando a perda da expressão de MTAP para o clone U251MTAP^{-/-} e ganho de expressão de MTAP para a linhagem SW1088MTAP^{+/+}. As amostras foram normalizadas pela proteína ACTB. Abreviação: CTRL+: Controle positivo de expressão de MTAP; CTRL-: Controle de expressão negativa de MTAP; WT: Wild Type; LB: Lentiblack; EV; empty vector; MTAP^{-/-}: gene MTAP deletado; MTAP^{+/+}: expressão do gene MTAP. * A presença de fluorescência verde para o clone SW1088LB é uma característica intrínseca do kit de superexpressão MTAP Lentivirus Human.

Anexo F - Genes diferencialmente expressos do clone U251MTAP-/-

| Gene | Grupo1 | Grupo2 | p.adj | Via biológica | Log2FC |
|----------------|-------------|--------|---------|--------------------|--------|
| ANGPT1 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,0072 | PI3K/RAS | 2.213 |
| ANGPT1 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,0051 | PI3K/RAS | 3.137 |
| BMP5 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,031 | TGF- β | -2.719 |
| BMP5 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,022 | TGF- β | -1.968 |
| BRIP1 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,0043 | DNA Repair | 1.223 |
| BRIP1 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,0054 | DNA Repair | 1.077 |
| COL11A1 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,006 | PI3K | -2.567 |
| COL11A1 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,006 | PI3K | -3.151 |
| ERBB2 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,012 | Driver | 1.440 |
| ERBB2 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,015 | Driver | 1.211 |
| FN1 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,0066 | PI3K | 2.471 |
| FN1 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,0066 | PI3K | 2.442 |
| IDH2 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,043 | Driver | 1.547 |
| IDH2 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,043 | Driver | 1.155 |
| MAPK10 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,00093 | WNT/MAPK/RAS | -2.974 |
| MAPK10 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,00097 | WNT/MAPK/RAS | -3.155 |
| NGFR | U251MTAP-/- | U251EV | 0,0038 | PI3K/RAS | 4.298 |
| NGFR | U251MTAP-/- | U251WT | 1,1E-05 | PI3K/RAS | 4.188 |
| NOTCH1 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,039 | NOTCH | 1.224 |
| NOTCH1 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,039 | NOTCH | 1.145 |
| PLAT | U251MTAP-/- | U251EV | 0,029 | TxMisReg | 1.707 |
| PLAT | U251MTAP-/- | U251WT | 0,029 | TxMisReg | 1.525 |
| RASGRF1 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,041 | MAPK/RAS | 2.385 |
| RASGRF1 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,041 | MAPK/RAS | 2.380 |
| SFRP1 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,05 | WNT | 1.541 |
| SFRP1 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,028 | WNT | 1.355 |
| SPP1 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,023 | PI3K | -1.190 |
| SPP1 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,023 | PI3K | -1.076 |
| TGFBR2 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,0084 | TGF- β | 1.153 |
| TGFBR2 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,012 | TGF- β | 1.570 |
| THBS1 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,0016 | TGF- β /PI3K | 2.737 |
| THBS1 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,018 | TGF- β /PI3K | 2.518 |
| TNFSF10 | U251MTAP-/- | U251EV | 0,012 | Apoptose | 2.515 |
| TNFSF10 | U251MTAP-/- | U251WT | 0,017 | Apoptose | 2.026 |

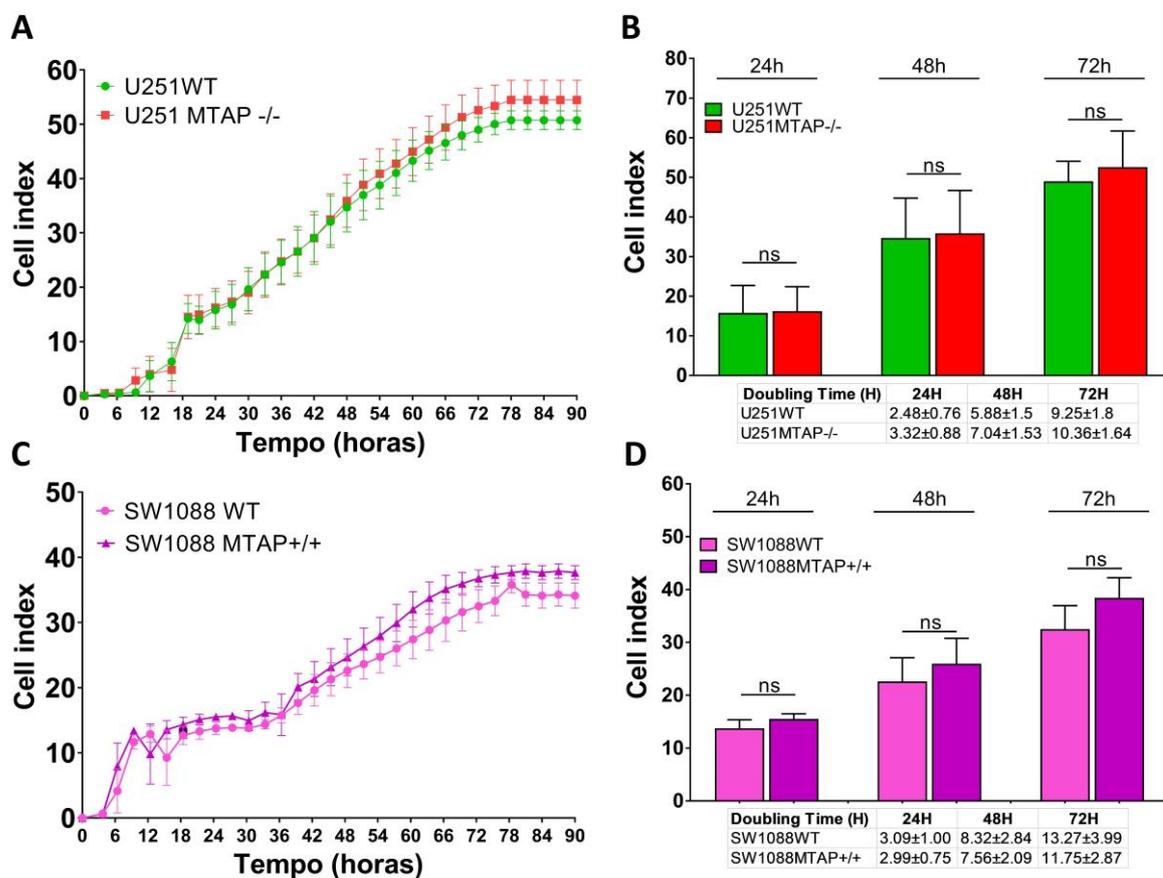
Abreviação: p.adj= p-valor ajustado, TxMisReg=Regulação transcricional, ($p < 0,05$, $\log_2FC \geq 2$)

Anexo G - Genes diferencialmente expressos do clone SW1088MTAP+/+

| Gene | Grupo1 | Grupo2 | p.adj | Via biológica | Log2FC |
|----------------|---------------|---------------|--------------|----------------------|---------------|
| E2F5 | SW1088MTAP+/+ | SW1088LB | 0,028 | TGF-β/Apoptosis | 1.370 |
| E2F5 | SW1088MTAP+/+ | SW1088WT | 0,02 | TGF-β/Apoptosis | 1.054 |
| ETV1 | SW1088MTAP+/+ | SW1088LB | 0,0011 | TxMisReg | 1.015 |
| ETV1 | SW1088MTAP+/+ | SW1088WT | 0,039 | TxMisReg | 2.132 |
| GPC4 | SW1088MTAP+/+ | SW1088LB | 0,0052 | WNT | -2.422 |
| GPC4 | SW1088MTAP+/+ | SW1088WT | 0,0052 | WNT | -2.754 |
| IL13RA2 | SW1088MTAP+/+ | SW1088LB | 0,027 | JAK-STAT | -2.816 |
| IL13RA2 | SW1088MTAP+/+ | SW1088WT | 0,026 | JAK-STAT | -2.651 |
| IL6R | SW1088MTAP+/+ | SW1088LB | 0,044 | JAK-STAT/PI3K | -1.005 |
| IL6R | SW1088MTAP+/+ | SW1088WT | 0,0012 | JAK-STAT/PI3K | -1.236 |
| MAP2K6 | SW1088MTAP+/+ | SW1088LB | 0,0012 | MAPK | 1.188 |
| MAP2K6 | SW1088MTAP+/+ | SW1088WT | 0,012 | MAPK | 1.476 |

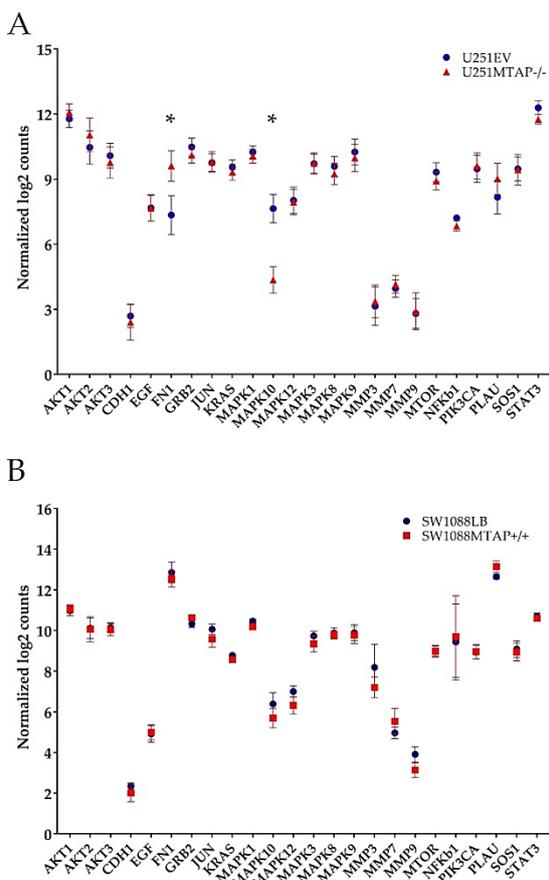
Abreviação: p.adj= p-valor ajustado, TxMisReg=Regulação transcricional, ($p < 0,05$, $\log_2FC \geq 2$)

Anexo H - Monitoramento da proliferação celular dos clones editados geneticamente



Monitoramento dinâmico da proliferação celular utilizando a tecnologia de impedância. Os valores representativos de cell index para as linhagens celulares U251MTAP^{-/-} vs. U251WT e SW1088MTAP^{+/+} vs. SW1088WT medido pelo aparelho de monitoramento em tempo real RTCA por 90 horas. Imagem representativa do cell index e tempo de duplicação celular entre 24 horas e 72 horas para as linhagens celulares U251MTAP^{-/-} vs. U251WT e SW1088MTAP^{+/+} vs. SW1088WT. Os dados foram expressos como média e desvio padrão a partir de três experimentos independentes. T Student: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, ns: não significativo.

Anexo I - Genes potencialmente associados as vias de migração e invasão celular



C

| Gene symbol | U251EV vs. U251MTAP-/- | | SW1088LB vs. SW1088MTAP+/+ | |
|-------------|------------------------|----------|----------------------------|---------|
| | Log2 fold change | P value | Log2 fold change | P value |
| AKT1 | -0.300679 | 0.21694 | -0.082069 | 0.5568 |
| AKT2 | -0.575185 | 0.223751 | 0.0418574 | 0.8997 |
| AKT3 | 0.312522 | 0.420259 | 0.100451 | 0.5264 |
| CDH1 | 0.280328 | 0.502035 | 0.321672 | 0.1619 |
| EGF | 0.0132111 | 0.970271 | -0.0856344 | 0.7111 |
| FN1 | -2.26458 | 0.000642 | 0.301598 | 0.2792 |
| GRB2 | 0.380227 | 0.119573 | -0.306777 | 0.0062 |
| JUN | -0.0403149 | 0.875647 | 0.480724 | 0.0353 |
| KRAS | 0.226071 | 0.297477 | 0.205682 | 0.0161 |
| MAPK1 | 0.185024 | 0.318219 | 0.270531 | 0.0014 |
| MAPK10 | 3.28527 | 0.000004 | 0.69565 | 0.0499 |
| MAPK12 | 0.0826666 | 0.814741 | 0.679801 | 0.0079 |
| MAPK3 | -0.0229861 | 0.933978 | 0.394076 | 0.0594 |
| MAPK8 | 0.354148 | 0.224085 | 0.0973489 | 0.4838 |
| MAPK9 | 0.276984 | 0.449948 | 0.113107 | 0.6378 |
| MMP3 | -0.217891 | 0.667721 | 0.986782 | 0.0808 |
| MMP7 | -0.198555 | 0.415061 | -0.56659 | 0.0727 |
| MMP9 | -0.0983363 | 0.857433 | 0.773959 | 0.0045 |
| MTOR | 0.399872 | 0.132401 | 0.0104491 | 0.9947 |
| NFKb1 | 0.377283 | 0.00676 | -0.267304 | 0.8157 |
| PIK3CA | -0.138251 | 0.704741 | -0.03119 | 0.8784 |
| PLAU | -0.854313 | 0.087655 | -0.489253 | 0.0028 |
| SOS1 | 0.0383801 | 0.918674 | 0.137552 | 0.5884 |
| STAT3 | 0.533702 | 0.007137 | 0.0950031 | 0.3135 |

Genes potencialmente associados as vias de migração e invasão celular. Gráfico boxplot superposto demonstrando da expressão gênica de 24 genes presentes no *Pan-Cancer pathway panel* para as linhagens celulares (A) U251MTAP^{-/-} e (B) SW1088MTAP^{+/+}. O erro no gráfico de barras indica o desvio padrão de cada gene analisado. C) lista dos 24 genes diferencialmente expressos para as linhagens celulares editadas geneticamente (U251MTAP^{-/-} e SW1088MTAP^{+/+}) comparadas as linhagens controle (U251EV e SW1088LB). O asterisco (*) representa os genes com diferença significativa ($p < 0,05$ e $\log_2FC > 2$).

Anexo J – Artigo publicado em revista Cells



Article

Loss of 5'-Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) is Frequent in High-Grade Gliomas; Nevertheless, it is Not Associated with Higher Tumor Aggressiveness

Weder Pereira de Menezes ¹, Viviane Aline Oliveira Silva ¹, Izabela Natália Faria Gomes ¹, Marcela Nunes Rosa ¹, Maria Luisa Corcoll Spina ¹, Adriana Cruvinel Carloni ¹, Ana Laura Vieira Alves ¹, Matias Melendez ¹, Gisele Caravina Almeida ², Luciane Sussuchi da Silva ¹, Carlos Clara ³, Isabela Werneck da Cunha ⁴, Glauca Noeli Maroso Hajj ⁴, Chris Jones ⁵, Lucas Tadeu Bidinotto ^{1,6,7} and Rui Manuel Reis ^{1,8,9,*}

- ¹ Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo 14.784-400, Brazil; wedermenezes1@gmail.com (W.P.d.M.); vivianeaos@gmail.com (V.A.O.S.); izabela.faria.tk@hotmail.com (I.N.F.G.); nr.marcela2@gmail.com (M.N.R.); mluisaspina@hotmail.com (M.L.C.S.); drybiomedic@gmail.com (A.C.C.); alves.anav@gmail.com (A.L.V.A.); matiasmelendez@gmail.com (M.M.); lsussuchi@gmail.com (L.S.d.S.); lucasbidinotto@gmail.com (L.T.B.)
- ² Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo 14.784-400, Brazil; giselecaravina@gmail.com
- ³ Department of Neurosurgery, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo 14.784-400, Brazil; carlosclara.neuro@gmail.com
- ⁴ A.C Camargo Cancer Center, São Paulo, São Paulo 015.080-10, Brazil; isabela.werneck@rededor.com.br (I.W.d.C.); ghajj@cipe.accamargo.org.br (G.N.M.H.)
- ⁵ Institute of Cancer Research, London SW7 3RP, UK; chris.jones@icr.ac.uk
- ⁶ Barretos School of Health Sciences, Dr. Paulo Prata - FACISB, Barretos, São Paulo 14.785-002, Brazil
- ⁷ Department of Pathology, Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Botucatu, São Paulo 18.618-970, Brazil
- ⁸ Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal
- ⁹ 3B's - PT Government Associate Laboratory, 4806-909 Braga/Guimarães, Portugal
- * Correspondence: ruireis.hcb@gmail.com; Tel.: +55-173-3216-600

Received: 27 December 2019; Accepted: 10 February 2020; Published: 20 February 2020



Abstract: The 5'-methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) gene is located in the chromosomal region 9p21. *MTAP* deletion is a frequent event in a wide variety of human cancers; however, its biological role in tumorigenesis remains unclear. The purpose of this study was to characterize the *MTAP* expression profile in a series of gliomas and to associate it with patients' clinicopathological features. Moreover, we sought to evaluate, through glioma gene-edited cell lines, the biological impact of *MTAP* in gliomas. *MTAP* expression was evaluated in 507 glioma patients by immunohistochemistry (IHC), and the expression levels were associated with patients' clinicopathological features. Furthermore, an in silico study was undertaken using genomic databases totalizing 350 samples. In glioma cell lines, *MTAP* was edited, and following *MTAP* overexpression and knockout (KO), a transcriptome analysis was performed by NanoString Pan-Cancer Pathways panel. Moreover, *MTAP*'s role in glioma cell proliferation, migration, and invasion was evaluated. Homozygous deletion of 9p21 locus was associated with a reduction of *MTAP* mRNA expression in the TCGA (The Cancer Genome Atlas) - glioblastoma dataset ($p < 0.01$). In addition, the loss of *MTAP* expression was markedly high in high-grade gliomas (46.6% of cases) determined by IHC and Western blotting (40% of evaluated cell lines). Reduced *MTAP* expression was associated with a better prognostic in the

adult glioblastoma dataset ($p < 0.001$). Nine genes associated with five pathways were differentially expressed in MTAP-knockout (KO) cells, with six upregulated and three downregulated in MTAP. Analysis of cell proliferation, migration, and invasion did not show any significant differences between MTAP gene-edited and control cells. Our results integrating data from patients as well as in silico and in vitro models provide evidence towards the lack of strong biological importance of MTAP in gliomas. Despite the frequent loss of MTAP, it seems not to have a clinical impact in survival and does not act as a canonic tumor suppressor gene in gliomas.

Keywords: glioma; glioblastoma; 5'-methylthioadenosine phosphorylase (MTAP); immunohistochemistry; tumor biology; proliferation; migration; invasion

1. Introduction

Gliomas represent the most common group of primary central nervous system (CNS) tumors [1]. According to the World Health Organization (WHO), these tumors can be categorized in low-grade gliomas (LGG, WHO grades I and II) and high-grade gliomas (HGG, WHO grades III and IV) according to their histological and molecular features [2,3]. Pilocytic astrocytoma (PA) (WHO grade I) is a good-prognosis childhood tumor, and conversely, glioblastoma (GBM) (WHO grade IV) occurs mainly in adults and has the poorest prognosis [2,4]. GBM has a mean survival of ~14 months after gold-standard therapy—surgery—followed by radiation therapy plus concomitant temozolomide [5–7]. GBM accounts for 70% of gliomas and can be subdivided in GBM *IDH*-wild type (the most frequent, >90%), previously known as primary (de novo) GBM and exhibiting a short clinical history, and GBM *IDH*-mutant, also called secondary GBM, which results from the malignant progression from lower-grade gliomas of diffuse (WHO grade II) or anaplastic (WHO grade III) astrocytomas [6,8] and is related to point mutations in *IDH1/2* genes.

In fact, several efforts have been made to improve the molecular characterization of GBM. In 2014, the International Society of Neuropathology recommended the support of molecular analysis for determining brain tumor entities [9] and, in 2016, the World Health Organization proposed the use of molecular features, including *IDH* mutation to GBM, in addition to histologic features in the tumor entities [3]. Additionally, there are many other biomarkers studied in GBMs as subjects of special attention. *TERT* promoter mutations have been found to be markedly high in primary GBMs (from 54% to 83% of the cases) [10]. Further studies have shown poorer survival of *TERT*-mutated patients in comparison to *TERT*-wild type [11–13]. Finally, studies have found an interaction between *TERT* promoter mutation and *MGMT* methylation. By performing pairwise comparisons, it was identified that *MGMT* methylation improved the survival of *TERT* promoter mutated-patients [14]. On the other hand, *TERT*-mutant and *MGMT* unmethylated patients presented the poorest prognosis, pointing to a possible impact in the use of *IDH*, *TERT*, and *MGMT* in the improvement of diffuse gliomas classification and prognostication [15].

We previously described the most frequent chromosomal alterations in a series of Brazilian astrocytomas [11]. We identified chromosome 7 gain, *EGFR* amplification, and losses in chromosomes 9p, 10, and 13, in accordance with other populations [4,11,16]. We also found 9p- deletion in approximately 50% of GBMs, affecting primarily the 9p21 locus where several tumor suppressor genes are located, including *CDKN2A/B* and *MTAP* [11].

MTAP (5'-methylthioadenosine phosphorylase) encodes a key enzyme involved in the metabolism of polyamines and purines [17–19]. This enzyme converts 5'-methylthioadenosine (MTA), a by-product of polyamine biosynthesis, into adenine and MTR-1-P (methylthioribose-1-phosphate), which are recycled into AMP (adenosine monophosphate) and methionine [19,20]. This protein is expressed virtually in all tissues throughout the body, and its homozygous deletion is frequently associated with solid and hematologic tumors such as mesothelioma, lung carcinoma, hepatocellular carcinoma, gastrointestinal

stromal tumors, metastatic melanoma, leukemias, and lymphoma [18,21–25]. Therefore, *MTAP* has been reported as a tumor suppressor gene [24,26–30]; however, many studies have demonstrated the contradictory function of *MTAP*. For instance, the loss of *MTAP* expression has been associated with inhibition of growth and progression of head and neck carcinoma and lung cancer by MTA accumulation [31,32]. Bistulfi et al. [33] showed that knockdown of *MTAP* blocks prostate cancer growth in vitro and *in vivo*. In addition, methionine deprivation acts by inhibiting cell migration, invasion, and metastasis in breast cancer [34]. Metabolic changes in tumors, especially those relating to polyamines metabolism, demonstrate that many mechanisms underlying *MTAP* function need to still be clarified [35,36]. In gliomas, loss of *MTAP* locus is also frequently reported [37–41]. Nevertheless, the clinical and the biological impacts of *MTAP* are poorly explored in gliomas [37,38,42].

Therefore, the aim of this study was to characterize the *MTAP* protein expression profile in a large series of glioma and to associate it with the patients' clinicopathological features. Moreover, by using glioma cell lines, the biological role of *MTAP* was evaluated. By integrating data from patients and in vitro models, this study showed that, despite the frequent loss of *MTAP*, it does not have a clinical impact in survival and does not act as a canonic tumor suppressor gene in gliomas.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Lines and Gene Editing

One cell line derived from normal astrocytes (NHA), seven short-term primary glioma cell lines, and 11 established glioma cell lines were evaluated. The *MTAP* positive U251 cell line was transfected with *MTAP* Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) (*MTAP*-CRISPR/Cas9 KO) or empty vector CRISPR/Cas9 Plasmid (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), leading to a U251 *MTAP*^{-/-} clone. The *MTAP* negative SW1088 cell line was transduced with the *MTAP* human lentivirus or the blank control lentiviral vector in accordance with the manufacturer's instructions (ABM Inc.[®], Richmond, BC, Canada), resulting in SW1088 *MTAP*^{+/+} clones. Detailed information about the cell lines used and the gene editing are described in the Appendix A material.

2.2. Patients

Adult and pediatric glioma tissues were obtained from 507 patients who underwent surgery for glioma at Barretos Cancer Hospital (BCH), Hospital of Clinics of Faculty of Medicine of São Paulo University (HCRP), AC Camargo Cancer Center, and The Institute of Cancer Research between 1980 and 2013. Histologic review of the slides was performed by expert neuropathologists (according to the latest WHO histopathological criteria) [3] to confirm the diagnosis. Overall, patient age ranged from 0.3 to 82.8 years (median: 57 years old). The stratification showed 49 (9.7%) patients in pediatric (0–19 years) and 458 (90.3%) in the adult group (>19 years). Histological subtypes of gliomas were distributed into diffuse astrocytoma (n = 18), anaplastic astrocytoma (n = 24), pediatric glioblastoma (n = 42), and adult glioblastoma (n = 423). This study was approved by the Ethics Committee of Barretos Cancer Hospital under approval number 630/2012, number 1175879 (961/2015), and AC Camargo Cancer Center (number 1485/10).

2.3. DNA Isolation

Tissue from a patient's tumor was manually microdissected from 4 µm unstained histological sections. DNA was isolated from each target using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the protocols provided by the supplier. The 260/280 and the 260/230 ratios were determined by a NanoDrop 2000C spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), and the DNA was quantified using Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Eugene, OR, USA) according to the supplier's protocol.

2.4. RNA Extraction and RT-qPCR

RNA from cultured cell lines was isolated using a modified TRIzol[®] reagent protocol (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) [43]. In brief, cultured cells were washed twice with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and 1.5 mL TRIzol[®] was added. Flasks were scraped, and TRIzol/cell mixture was transferred to a 1.5 mL eppendorf tube. Subsequently, 200 μ L of chloroform was added, homogenized for 30 s, and centrifuged at 17,982 \times *g* for 15 min. The supernatant was collected, and 750 μ L isopropanol was added and kept overnight at -20 $^{\circ}$ C. Samples were then centrifuged at 17,982 \times *g* for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. The resulting RNA pellet was washed twice with 75% ethanol after removing the supernatant. Finally, the RNA pellet was dried and dissolved in 20 μ L of ultra-pure water. The integrity of all the RNA preparations was checked by RNA 600 nano assay (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and RNA concentrations were measured with NanoDrop[™] 2000C spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using Superscript III reverse transcriptase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) according to the supplier protocol.

RT-qPCR reactions were carried out in a total volume of 10 μ L using 2X Fast SYBR[®]Green Master Mix kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) containing 100 ng (1 μ L) of cDNA, 10 μ M (0.8 μ L) of each primer, and 7.4 μ L of ultra-pure water in a final volume of 20 μ L. Gene amplification was performed with the programmable cyclic reactor StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Grand Island, USA) as follows: 95 $^{\circ}$ C for 10 min; 40 cycles at 95 $^{\circ}$ C for 15 s; and 64 $^{\circ}$ C for 1 min. The primers used for RT-qPCR amplification of *MTAP* were forward primer: 5'-TCTTGTGCCAGAGGAGTGTG-3'; reverse primer: 5'-ACCATTGTCCCTTTGAGTG-3'. Samples were then normalized using the housekeeping gene *HPRT1* (forward primer: 5'-GACCAGTCAACAGGGGACAT-3'; reverse primer: 5'-CTGCATTGTTTTGCCAGTG-3'). The normalized expressions of the gene of interest were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The primers used were synthesized by Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, and all reactions were performed in three biological replicates.

2.5. IDH1 Mutation Analysis

The analysis of hotspot mutations of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1-exon 4) was performed by PCR followed by direct sequencing. Briefly, the IDH1 region of interest was amplified by PCR using the following primers: 59-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT-39 (forward) and 59-CACATTATTGCCAACATGAC-39 (reverse) [11]. An amplification PCR reaction was performed in a total volume of 15 μ L comprising: 1 μ L of DNA, 1X buffer solution, 2 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 0.3 μ M of each primer set, and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Eugene, OR, USA), and was performed in a Veriti 96-well Thermal Cycler with an initial denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 10 min, amplification for 40 cycles with denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 45 s, annealing at 58 $^{\circ}$ C for 45 s, extension at 72 $^{\circ}$ C for 45 s, and a final extension at 72 $^{\circ}$ C for 10 min. Amplification of PCR products was confirmed by gel electrophoresis. PCR sequencing was performed using the Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA) and an ABI PRISM 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA).

2.6. TERT Mutation Analysis

The analysis of hotspot mutations in the promoter region of the telomerase reverse transcriptase gene (*TERT*) was performed by PCR followed by direct Sanger sequencing [44]. Briefly, the *TERT* promoter region was amplified by PCR using the following primers: 59-AGTGGATTTCGCGGGCACAGA-39 (forward) and 59-CAGCGCTGCCTGAAACTC-39 (reverse), leading to a 235 bp PCR product containing C228T and C250T mutations. Amplification by PCR was performed with an initial denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 30 s, annealing at 64 $^{\circ}$ C for 90 s, elongation at 72 $^{\circ}$ C for 30 s, and final elongation at 72 $^{\circ}$ C for 7 min. Amplification of PCR products was confirmed by gel electrophoresis. PCR sequencing was

performed using the Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA) and an ABI PRISM 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA).

2.7. MGMT Promoter Methylation

To evaluate the methylation status of the promoter region of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene (*MGMT*), sodium bisulfite treatment of DNA (300–1500 ng) was performed using the Epitect Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Methylation-specific (MS) PCR for the *MGMT* promoter was performed as described previously [45].

2.8. Western Blotting Analysis

The Western blot analysis was performed as previously described [42]. In brief, cells were lysed with lysis buffer (50 mM Tris; pH 7.6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM Na₃VO₄; 10 mM NaF; 10 mM sodium pyrophosphate; 1% NP-40) containing protease inhibitor cocktail (0.01 M EDTA; 1 mM DTT; 1 mM Leupeptin; 1 mM PMSF; and 1 μM Aprotinin). The cell lysate was placed on ice for 60 min and centrifuged at 17,982× *g* for 15 min. The total protein was quantified using the Bradford method (Quick Start™ Bradford Protein Assay; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Total proteins were separated by 12% polyacrylamide gel and transferred onto Trans-Blot Turbo Midi Nitrocellulose Transfer Packs (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membrane was incubated with primary followed by secondary antibodies after blocking with 5% non-fat milk. Immunodetection was performed using the ECL KIT (Amersham Biosciences, Uppsala, Uppland, Sweden) in ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) and quantified by the platform for scientific image analysis ImageJ (NIH) [46]. The following antibodies were used: polyclonal anti-MTAP antibody (Proteintech, Rosemont, IL, USA) diluted 1:800 and anti-β actin antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) diluted at 1:2000.

2.9. Immunohistochemistry Analysis

For the immunohistochemistry (IHC) analysis, a tissue microarray (TMA) was constructed with tumors areas obtained from each case and inserted in the recipient paraffin block using the tissue arrayer MTA-1 platform (Beecher Instruments™, Silver Springs, MD, USA). To represent possible heterogeneity of tumors, two 1.0 mm cores from each case were used in TMA blocks. IHC was performed from 4.0 μm sections of the TMA block for MTAP, as previously described [42]. Glass slides were deparaffinized and subjected to antigen retrieval in a Pascal pressure chamber (Dako, Carpinteria, CA, USA). The primary MTAP polyclonal antibody (Proteintech, Rosemont, IL, USA) was diluted 1:300 with the background-reducing medium and kept at 4 °C overnight. The Avidin–Biotin Complex (ABC) method was performed according to the manufacturer's recommendations with staining with DAB (3,3' Diaminobenzidine) and counterstaining with Harris' hematoxylin (Leica Biosystems, Newcastle, UK). The extension of immunoreactions was measured according to the following criteria: 0 = negative; 1 = ≤25% of positive cells; 2 = 25–50% of positive cells; 3 = ≥50% of positive cells. Moreover, the intensity of reaction was defined as: 0 = negative; 1 = weak; 2 = moderate; 3 = strong. Cases presenting the sum of the scores (extension and intensity) between 0 and 3 were considered negative, and those presenting scores between 4 and 6 were considered positive. Non-neoplastic tissue microarray (BN 961-Biomax INC, Rockville, MD, USA) was used as a positive control for IHC reactions.

2.10. In Silico Analysis

MTAP copy number alterations (CNA) data were downloaded from comparative genomic hybridization/single-nucleotide polymorphism (CGH_SNP) arrays (n = 350) [47]. Based on normalized *MTAP* values, patients were stratified in normal (n = 150) (>−0.1) and *MTAP* homozygous deletion carriers (n = 200) (≤−1.5). For expression analysis, *MTAP* mRNA G450 array data were downloaded (n = 299) [47]. The median *MTAP* value was calculated considering all samples. Patients with *MTAP*

values at least 20% higher than the median were considered positive ($n = 138$), while those with *MTAP* values at least 20% lower than the median were considered negative ($n = 161$). Finally, for methylation analysis, *MTAP* methylation beta values were downloaded from 283 samples [47]. Patients were stratified as hypermethylated ($\text{beta} > 0.5$) and hypomethylated ($\text{beta} \leq 0.5$). Integrated in silico analyses of *MTAP* CNA expression and methylation status were performed using the TCGA2STAT package implemented in R software downloaded from <https://www.r-project.org/>. Moreover, in silico analysis was conducted to evaluate *MTAP* expression in glioblastoma subtypes in The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset. The median *MTAP* value was calculated considering all samples.

2.11. mRNA NanoString™ Data Analysis

Gene expression analysis on *MTAP* gene-edited U251 and SW1088 cell lines was performed using the NanoString nCounter PanCancer Pathways panel (730 gene transcripts distributed in 13 biological pathways) according to the manufacturer's standards (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA). Moreover, 24 of 730 genes associated with tumor aggressiveness were selected, and the differential expression was evaluated to better understand the function of *MTAP* gene-edited on migration and invasion ability. Briefly, 100 ng aliquots of RNA were hybridized with probe pools, hybridization buffer, and TagSet reagents in a total volume of 30 μL and incubated at 65 °C for 20 h. After codeset hybridization overnight, the samples were washed and immobilized to a cartridge using the Nanostring nCounter Prep Station (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) for 4 h. Finally, the cartridges containing immobilized and aligned reporter complexes were scanned in the nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA), and image data were subsequently generated using the high-resolution setting, which takes 577 images per sample. Quality control assessment of raw NanoString gene expression counts was performed with nSolver Analysis Software version 2.5 and the default settings (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA). Normalization with internal positive controls and housekeeping genes was performed in R statistical environment using NanostringNorm package [48]. Normalized log₂ mRNA expression values were used for subsequent data analysis. Genes with fold change (FC) ± 2 and $p < 0.05$ were considered significant.

2.12. xCELLigence Proliferation Assay

U251 *MTAP*^{-/-} and SW1088 *MTAP*^{+/+} cell proliferation was monitored with a real-time cell analyzer using xCELLigence Technology (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). This impedance value was measured by the Real Time Cell Analysis Dual purpose (RTCA DP) system and is reported in the dimensionless unit of cell index. Prior to seeding of cells in the 96-well E-plate, 100 μL Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) was added to wells, and background was recorded. U251 *MTAP*^{-/-}; U251 EV; U251 WT and SW1088 *MTAP*^{+/+}; SW1088 LB; SW1088 WT were split, and 5–10 $\times 10^3$ cells in 100 μL of media supplemented with fetal bovine serum (FBS; 10%) were added to each well. Real-time monitoring of cell proliferation measured as cell index was recorded every 5 min for up to 72 h. Data represent changes in cell index over time.

2.13. Transwell Migration Assay

Boyden chamber type Transwell permeable supports (Corning, Chelmsford St. Lowell, MA, USA) were used to examine the ability of cells to invade the 8 μm pore size membrane (1×10^5 pores/cm²) and migrate through the polyethylene terephthalate (PET)-membrane surface. The CRISPR-edited cell line (U251 *MTAP*^{-/-}) and the stable expression cell line (SW1088 *MTAP*^{+/+}) beside the control cell lines were seeded into the inner chamber at 5×10^4 and 10×10^4 , respectively, in 500 μL of DMEM without serum and allowed to migrate onto the coated undersurface at 37 °C in a CO₂ incubator for 24 h. At the bottom, 750 μL of DMEM supplemented with 10% FBS was added to the chambers. Migrated cells were fixed and stained with hematoxylin and eosin for three minutes followed by phosphate-buffered saline (PBS) washing of the membranes. The migrated cells in each well were

counted in ten different fields per experiment under the microscope. The mean values were obtained from three replicate experiments and were subjected to t-test.

2.14. Cell Invasion Assay

U251 MTAP^{-/-} and SW1088 MTAP^{+/+} beside control cells were cultured to near confluence in DMEM+10% FBS. Cells were harvested by trypsinization and washed and suspended in DMEM without serum at 2×10^5 and 4×10^5 cells/mL. Prior to preparing the cell suspension, the dried layer of matrigel matrix was rehydrated with serum-free DMEM for 1 h at 37 °C. The rehydration solution was carefully removed, 750 μ L DMEM containing 10% FBS was added to each well as a chemoattractant, and 500 μ L ($1\text{--}2 \times 10^5$ cells) of cell suspension was added into the inner chamber Corning, Chelmsford St. Lowell, MA, USA). The plates were incubated for 24 h at 37 °C. The invasive cells on the bottom surface of the membrane were fixed and stained with hematoxylin and eosin for three minutes followed by 1X PBS washing of the membranes. The migrated cells in each well were counted in ten different fields per experiment under the microscope. The mean values were obtained from three replicate experiments and were subjected to t-test.

2.15. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using SPSS version 24 for Windows™ (IBM, Chicago, Ill, USA) considering statistically significant values of $p < 0.05$. Levene and Kolmogorov–Smirnov tests were performed to test the variance and the normality of the data. One-way ANOVA or Kruskal–Wallis tests were performed to compare copy number, expression, and methylation of *MTAP* profiles. ANOVA followed by Tukey post hoc test was performed to evaluate *MTAP* expression in glioblastoma subtypes. The association between clinicopathological categorical variables and *MTAP* was analyzed by Pearson’s chi-square test or Fisher exact test. The overall survival (OS) analysis was done by constructing Kaplan–Meier curves, and the log-rank test was applied for the comparison between the obtained curves. OS was defined as the time between the date of diagnosis and the date of the patient’s last information or death. Cell line experiments were analyzed with Student’s t-test and are expressed as mean values of at least three independent experiments \pm standard errors. Differences were considered significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Loss of *MTAP* Expression is Associated with 9p21 Locus Deletion in Gliomas

Initially, in order to understand the molecular mechanism underlying *MTAP* expression, we investigated the impact of copy number alteration (CNA) of 9p21 locus on *MTAP* mRNA expression levels in a TCGA-GBM dataset ($n = 350$). As shown in Figure 1A, *MTAP* gene expression was significantly ($p < 0.01$) lower in the homozygously deleted group ($n = 169$) than in those with normal ploidy ($n = 181$). Since *MTAP* regulation can also occur by epigenetic mechanisms [27], we then evaluated the association of *MTAP* mRNA expression and the methylation status in 283 samples from the TCGA-GBM dataset (Figure 1B). *MTAP* gene promoter was methylated in 60 of 283 (21.2%) samples. However, no association of methylation status and *MTAP* expression levels in glioblastomas was observed (Figure 1B, $p = 0.633$). Additionally, we evaluated the *MTAP* expression levels in the five molecular subtypes of TCGA-GBM ($n = 291$) (Table 1). We found loss of *MTAP* expression greater than 50% in almost all subtypes analyzed, except for the glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP) (Table 1). The classical subtype presented a higher frequency of loss of *MTAP* gene expression with 65.2% (43/66) against only 7.4% (2/25) for the G-CIMP+ subtype ($p < 0.001$) (Table 1).

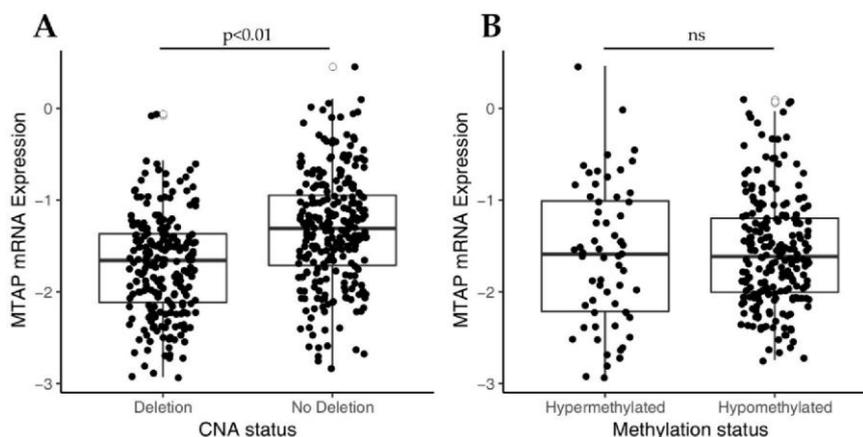


Figure 1. Analysis of *MTAP* mRNA expression in The Cancer Genome Atlas glioblastoma (TCGA-GBM) dataset correlates to copy number alterations (CNA) status for 9p21 locus and *MTAP* promoter methylation. (A) Box-plot analysis showing downregulation in *MTAP* expression in 9p21 homozygous deleted samples compared to matched normal samples (p -value < 0.01). (B) Box-plot of *MTAP* expression and promoter methylation in TCGA-GBM dataset. *ns*: not significant p -value.

Table 1. *MTAP* differential expression in subtypes of glioblastoma.

| Subtype | <i>MTAP</i> Positive | <i>MTAP</i> Negative | Total | p -Value |
|-------------|----------------------|----------------------|-----------|------------|
| Classical | 23 (34.8%) | 43 (65.2%) | 66 (100%) | <0.001 |
| Mesenchymal | 36 (41.9%) | 50 (58.1%) | 86 (100%) | |
| Neural | 19 (37.3%) | 32 (62.7%) | 51 (100%) | |
| Proneural | 30 (49.2%) | 31 (50.8%) | 61 (100%) | |
| G-CIMP+ | 25 (92.6%) | 2 (7.4%) | 27 (100%) | |

G-CIMP+: glioma-CpG island methylator phenotype.

Next, in a set of eleven established and seven short-term primary gliomas cells, we compared *MTAP* copy number with *MTAP* mRNA and protein expression by RT-qPCR and Western blot, respectively (Supplementary Table S1). Overall, we found loss of *MTAP* mRNA expression in 33.3% (6/18) of the cell lines evaluated (Figure 2), particularly in 36.3% (4/11) of established cell lines, with 25% (1/4) for pediatric and 42.8% (3/7) for adult glioma cell lines (Figure 2A), and 29% (2/7) of patient-derived glioma cell lines (Figure 2B). A 100% concordance was found between protein and mRNA levels (Figure 2C–F). Of note, 40% (6/15) of high-grade glioma (HGG; WHO grade III–IV) cell lines presented loss of *MTAP* expression, contrasting with 0% in low-grade glioma (LGG; WHO grade I–II) cell lines (0/3) (Figure 2A,B). Considering only the GBM subtype, a lack of *MTAP* mRNA and protein expression was found in 33.3% (4/12) of samples, with 44.4% (4/9) of adult GBM cell lines having no detectable *MTAP* in the cell extracts (Figure 2C,D). These results suggest that *MTAP* loss of expression is associated with higher-grade gliomas.

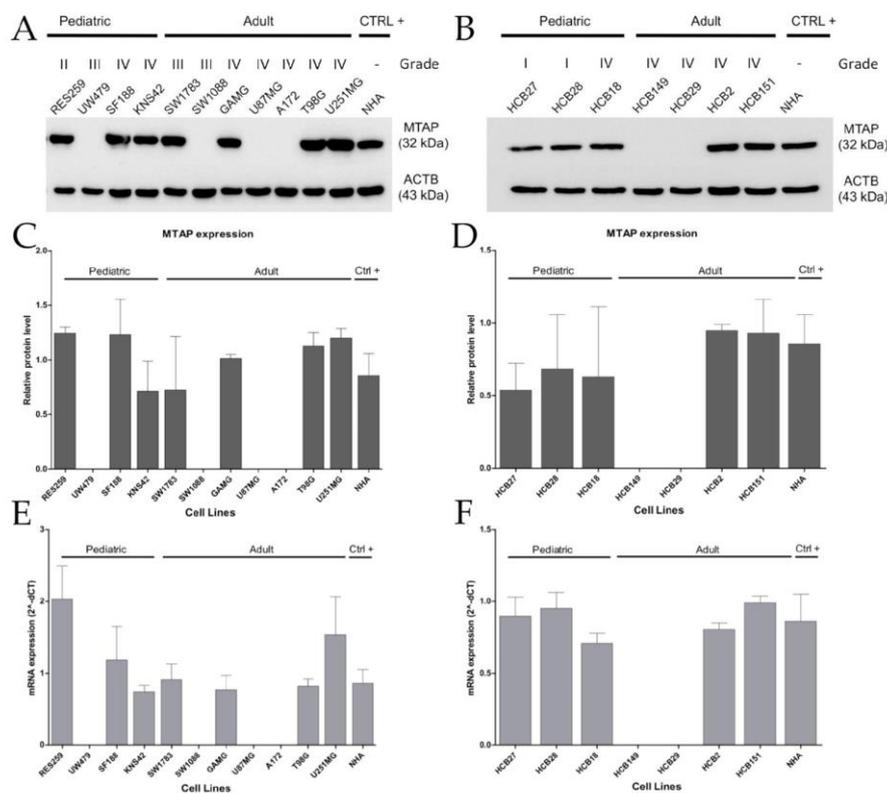


Figure 2. Loss of MTAP expression is more present in high-grade glioma (HGG) cell lines. MTAP protein expression analysis of established (A) and short-term primary glioma cells (B) assessed by Western blotting. Plot representative of MTAP protein (C,D) and gene (E,F) expression in glioma cell lines. Samples were normalized to *HPRT-1* (mRNA) and beta-actin (ACTB) (protein) as an endogenous control. Abbreviations: CTRL+: positive control.

3.2. MTAP Expression Profile and Clinicopathological Association in Gliomas

We further evaluated MTAP protein expression by immunohistochemistry in a large set of diffuse gliomas ($n = 507$) (Table 2 and Figure 3). Overall, we found loss of MTAP expression in 45.95% (233/507) of cases, this being observed in 27.8% (5/18) of diffuse astrocytoma, 50.0% (12/24) of anaplastic astrocytoma, 45.6% (193/423) of adult glioblastoma, and 54.8% (23/42) of pediatric glioblastoma (Figure 3A–E). When we stratified the samples by grade, the loss of MTAP expression in the high-grade glioma subgroup was almost two-fold greater (46.6%, 228/489) than in the low-grade glioma subgroup (27.8%; 5/18) (Table 2 and Figure 3E). However, we did not observe a significant association between MTAP expression and other patients' clinicopathological features, such as gender, age, or Karnofsky Performance Status (KPS), except for tumor location ($p = 0.013$) (Table 2).

Table 2. Clinicopathological features of glioma patients and association with *MTAP* expression.

| | Total | (%) | MTAP Expression | | p-Value |
|--|-------|--------|-----------------|--------------|--------------|
| | | | Negative (%) | Positive (%) | |
| Gender (N = 491) | | | | | |
| Male | 300 | (61.1) | 141 (47.0) | 159 (53.0) | 0.503 |
| Female | 191 | (38.9) | 83 (43.5) | 108 (56.5) | |
| Age group (N = 504) | | | | | |
| 0–19 | 49 | (9.7) | 26 (53.1) | 23 (46.9) | 0.479 |
| 20–59 | 256 | (50.8) | 112 (43.8) | 144 (56.2) | |
| >59 | 199 | (39.5) | 92 (46.2) | 107 (53.8) | |
| Location (N = 210) | | | | | |
| Frontal Lobe | 88 | (41.9) | 24 (27.3) | 64 (72.7) | 0.013 |
| Parietal Lobe | 41 | (19.5) | 9 (22.0) | 32 (78.0) | |
| Temporal Lobe | 66 | (31.4) | 28 (42.4) | 38 (57.6) | |
| Occipital Lobe | 10 | (4.8) | 5 (50.0) | 5 (50.0) | |
| Cerebellum | 5 | (2.4) | 4 (80.0) | 1 (20.0) | |
| KPS (N = 168) | | | | | |
| <70 | 75 | (44.6) | 11 (14.7) | 64 (85.3) | 0.539 |
| >70 | 93 | (55.4) | 18 (19.4) | 75 (80.6) | |
| Grade (N = 507) | | | | | |
| Low Grade | 18 | (3.6) | 5 (27.8) | 13 (72.2) | 0.149 |
| High Grade | 489 | (96.4) | 228 (46.6) | 261 (53.4) | |
| Histologic Subtype (N = 507) | | | | | |
| DA (WHO Grade II, NOS) | 18 | (3.6) | 5 (27.8) | 13 (72.2) | 0.272 |
| AA (WHO Grade III, NOS) | 24 | (4.7) | 12 (50.0) | 12 (50.0) | |
| Ped. GBM (WHO Grade IV, NOS) | 42 | (8.3) | 23 (54.8) | 19 (45.2) | |
| Ad. GBM (WHO Grade IV, NOS) | 423 | (83.4) | 193 (45.6) | 230 (54.4) | |
| | | | | | |
| GBM status mutation (N = 460) | | | | | |
| IDH1 mutation (N = 229) | | | | | |
| No | 220 | (96.1) | 117 (53.2) | 103 (46.8) | 0.185 |
| Yes | 9 | (3.9) | 7 (77.8) | 2 (22.2) | |
| TERT promoter mutation (N = 45) | | | | | |
| No | 11 | (24.4) | 3 (27.3) | 8 (72.7) | 0.687 |
| Yes | 34 | (75.6) | 7 (20.6) | 27 (79.4) | |
| MGMT promoter methylation (N = 186) | | | | | |
| No | 120 | (64.5) | 75 (62.5) | 45 (37.5) | 0.753 |
| Yes | 66 | (35.5) | 39 (59.1) | 27 (40.9) | |

Abbreviation: DA: diffuse astrocytoma, AA: anaplastic astrocytoma, Ped. GBM: pediatric glioblastoma, Ad. GBM: adult glioblastoma KPS: Karnofsky Performance Status, NOS: not otherwise specified. T-test ($p < 0.05$).

Following the assessment of *TERT*, *IDH1* mutational profile, and *MGMT* methylation status in a subset of cases, the association of these molecular alterations with the loss of *MTAP* protein expression was evaluated. No significant association was observed (Table 2).

Importantly, we evaluated the impact of *MTAP* expression on overall survival (OS) of patients diagnosed with GBMs. In total, 398 adult patients were included in the OS analysis from which 83.1% ($n = 331$) died during total observation time: 76.6% ($n = 138$) in the *MTAP*-negative group and 88.5% ($n = 193$) in the *MTAP*-positive group (Figure 4A). We found that, in adult glioblastoma, patients exhibiting a lack of *MTAP* expression had better survival than those presenting *MTAP* expression (median survival of 9.8 ± 0.86 vs. 6.23 ± 0.70 months, respectively, $p = 0.00023$ in log-rank test) (Figure 4A). Two-year OS rates were 10.6% for the *MTAP*-negative group and 7.6% for the *MTAP*-positive group. In the pediatric context, 40 pediatric glioblastoma patients included in the analysis—86.3% ($n = 19$) in the *MTAP*-negative group and 77.7% ($n = 14$) in the *MTAP*-positive group—died during the total observational time (Figure 4B). There was no association of *MTAP* loss and patients' OS, with a median OS of 13.0 ± 1.71 months in the *MTAP*-negative group and 14.0 ± 4.83 months for the *MTAP*-positive

group ($p = 0.499$ in log-rank test) (Figure 4B). The two-year OS rates were 7.2% and 5.56% for MTAP-negative and MTAP-positive groups, respectively.

In order to extend these findings, we performed *in silico* survival analysis considering CNA status in TCGA-GBM datasets ($n = 246$). The analysis did not demonstrate a significant difference between *MTAP* CNA and overall survival (Figure 4C; $p = 0.942$). We further evaluated disease-free survival (DFS) considering relapse and death as endpoints. Similarly, the five-year DFS was not different between *MTAP* groups (Figure 4D; $p = 0.230$).

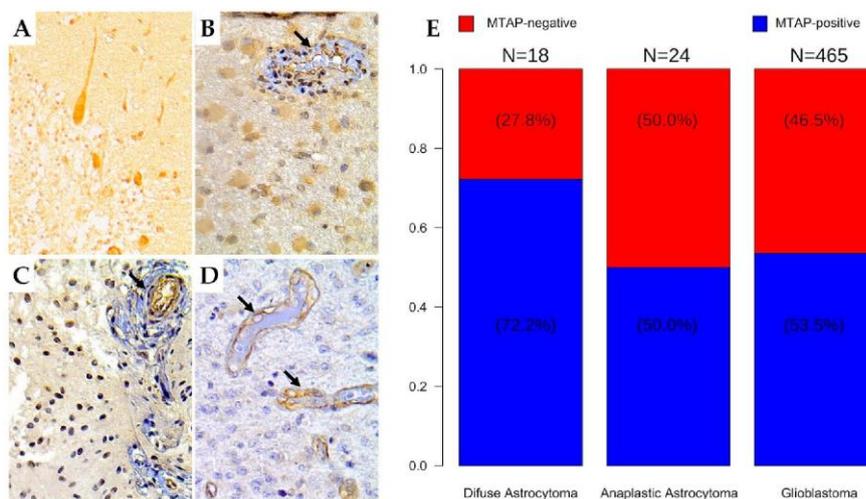


Figure 3. Immunohistochemistry staining for MTAP in human brain tumor tissues. The human brain tissue slide used for this study contained 507 cases of patients with different grades of gliomas in duplicates. Representative images from (A) normal cerebellum tissue (positive control); (400×) (B) diffuse astrocytoma (grade II); (400×) (C) anaplastic astrocytoma (grade III); (400×) (D) glioblastoma (grade IV); (400×). Arrows indicate vessels with endothelial staining for MTAP protein (positive internal control). (E) Frequency of loss of MTAP protein expression in the glioma dataset according to histologic subtype.

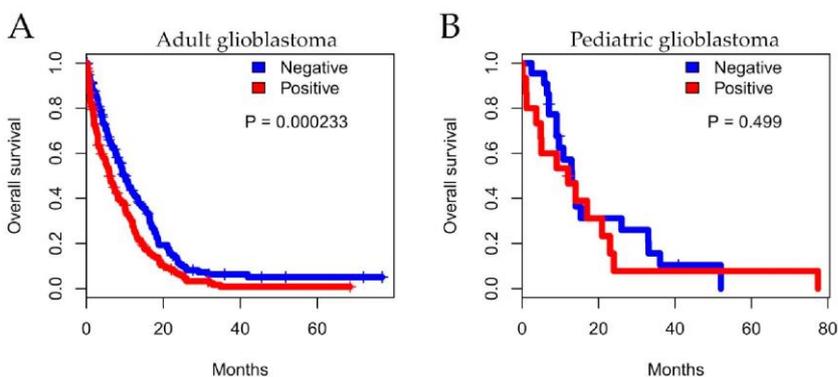


Figure 4. Cont.

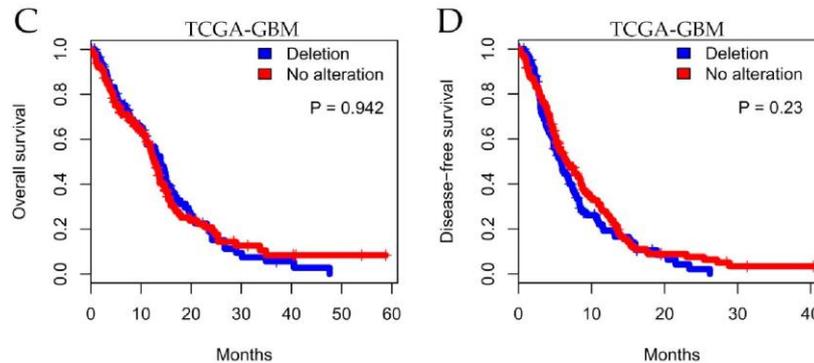


Figure 4. Kaplan–Meier analysis for *MTAP* expression associated with patient survival. Overall survival for a series of patients with glioma diagnosis according to histopathological grade. Shown for (A) adult glioblastoma, (B) pediatric glioblastoma, and (C) TCGA-GBM dataset status and (D) five-year disease-free survival (DFS) for TCGA-GBM dataset.

3.3. *MTAP* Cell Line Editing and Differential Gene Expression

To further underpin the *MTAP* biological role in gliomas, the U251 cell line, which expressed *MTAP*, was transfected with *MTAP* CRISPR/Cas9 KO to create the stable knockout clones (U251MTAP^{-/-}). On the other hand, SW1088 cells that normally do not express *MTAP* were transduced by the *MTAP* human lentivirus to establish *MTAP* expression clones (SW1088MTAP^{+/+}). Stable cell lines were confirmed by Western blotting post puromycin selection (Supplementary Figure S1).

After *MTAP* gene editing, the transcriptomic profiles of U251MTAP^{-/-} and SW1088MTAP^{+/+} cells as well as control cells (U251EV and SW1088LB) and parental cells (U251WT and SW1088WT) were evaluated for the expression of specific genes using the NanoString PanCancer Pathways Panel, which assessed thirteen canonical pathways (Notch, Wnt, Hedgehog, chromatin modification, transcriptional regulation, DNA damage control, transforming growth factor-beta (TGF-beta), mitogen-activated protein kinase (MAPK), The Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT), Phosphoinositide 3-kinase (PI3K), RAS, cell cycle, and apoptosis). In the U251 cells, we found that the U251MTAP^{-/-} clone showed 17 differentially expressed genes in comparison with controls, with seven (*ANGPT1*, *NGFR*, *FN1*, *COL11A1*, *SPP1*, *RASGRF1*, and *MAPK10*) being associated with the PI3K/RAS/MAPK pathways, three (*TGFBR2*, *THBS1*, and *BMP5*) with the TGF- β pathway, two (*IDH2* and *ERBB2*) belonging to the Driver pathway, and five genes (*TNFSF10*, *SFRP1*, *PLAT*, *NOTCH1*, and *BRIPI1*) associated with other pathways (Figure 5A, Supplementary Table S2). When analyzing only differentially expressed genes (p . adjusted <0.05 ; $\log_2FC \geq \pm 2$), we found six upregulated (*ANGPT1*, *FN1*, *NGFR*, *RASGRF1*, *THBS1*, and *TNFSF10*) and three downregulated genes (*BMP5*, *COL11A1*, and *MAPK10*) in the *MTAP* KO cells (Figure 5B).

We further performed the same approach in the SW1088 gene-edited cells. In the SW1088MTAP^{+/+} clone, we observed significant alterations in six genes (*IL6R*, *GPC4*, *IL13RA2*, *MAP2K6*, *E2F5*, and *ETV1*) belonging to JAK-STAT, PI3K, WNT, MAPK, transcriptional regulation, and apoptosis pathways (Figure 5C, Supplementary Table S3). Following adjustment (p -adjusted <0.05 ; $\log_2FC \geq \pm 2$), only *GPC4* and *IL13RA2* were differentially expressed when compared with control cells (Figure 5D, Supplementary Table S3). Subsequently, an analysis of the functional connections among the proteins encoded by the 17 and the six genes differently expressed by U251MTAP^{-/-} and SW1088MTAP^{+/+} was performed using STRING software. For U251MTAP^{-/-} cell, 11 of 17 genes had at least two connections, as shown in Figure 5E. Notably, these 11 genes were centered on five genes (*NOTCH1*, *ANGPT1*, *ERBB2*, *THBS1*, and *FN1*). On the other hand, for SW1088MTAP^{+/+}, only *IL6R* and *MAP2K6* showed the signal connection (Figure 5F).

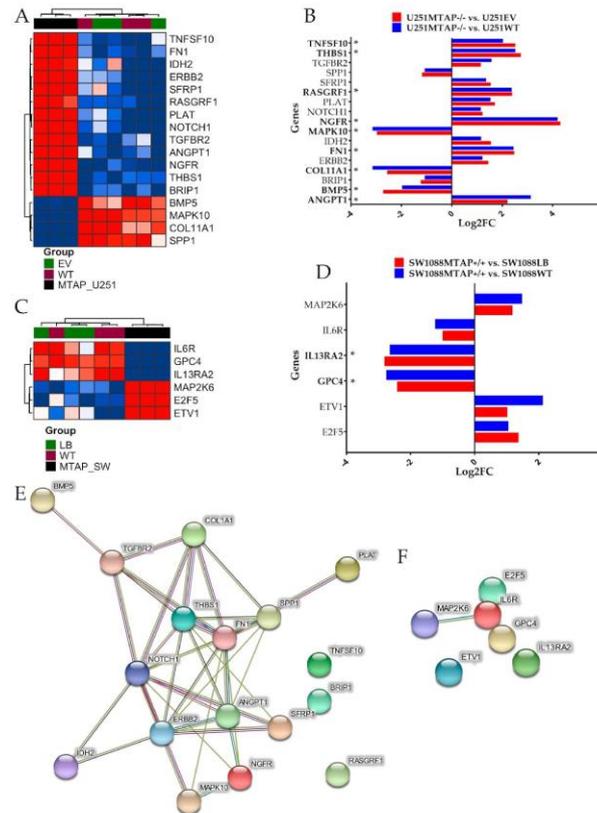


Figure 5. Detection of differentially expressed genes affected by *MTAP* gene-edited in glioma cell lines. (A) Heatmap representing the expression profile of the most differentially expressed genes for U251MTAP^{-/-} cell compared to U251EV and U251WT cells. (B) Bar plots showing gene expression as the mean SD of log changes of U251MTAP^{-/-} relative to U251EV and U251WT cells. (C) Heatmap representing the expression profile of the most differentially expressed genes for SW1088MTAP^{+/+} cell compared to SW1088LB and SW1088WT cells. (D) Bar plots showing the gene expression as the mean SD of log changes of SW1088MTAP^{+/+} relative to SW1088LB and SW1088WT cells. (E,F) Isolated networks of protein–protein interaction using STRING (<http://www.string-db.org>). The weight of these lines represents the confidence within which a predicted interaction occurs. Interactions networks for 17 and six proteins differentially regulated in U251MTAP^{-/-} and SW1088MTAP^{+/+} cells compared to controls U251EV and SW1088LB, respectively. Rows represent genes and columns represent cell lines. Red pixels: upregulated genes; blue pixels: downregulated genes. The intensity of each color denotes the standardized ratio between each value and the average expression of each gene across all samples. Each sphere represents an individual protein, and edges represent protein–protein associations. A red line indicates the presence of fusion evidence; a green line indicates neighborhood evidence; a blue line indicates co-occurrence evidence; a purple line indicates experimental evidence; a yellow line indicates text-mining evidence; a light blue line indicates database evidence; and a black line indicates co-expression evidence. Asterisks (*) labeling the bar indicates a significant difference (p -value < 0.05 and $\log_2FC \geq \pm 2$) between the gene expression of respective groups and the control. The network nodes represent proteins. Edges represent protein–protein associations. Student t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant

3.4. MTAP Deletion Does Not Modulate Glioma Cell Proliferation

To address the functional impact on cell proliferation, U251MTAP^{-/-}, U251EV, and U251WT (1×10^5 cells) as well as SW1088MTAP^{+/+}, SW1088LB, and SW1088WT (5×10^3 cells) were seeded in E-plates, and then the cell index and the doubling time were evaluated (Figure 6). We observed that U251MTAP^{-/-} showed analogous kinetic trace characteristics when compared to U251EV after 72 h (Figure 6A). When we analyzed the cell doubling time, within 24 h (cell doubling time 2.36 ± 1.51 vs. 3.32 ± 0.88 ; $p = 0.400$) and persisting up to 72 h (cell doubling time; 10.36 ± 1.64 vs. 11.64 ± 1.40 , $p = 0.800$), the U251MTAP^{-/-} cell showed increased proliferation rates in relation to U251EV, although it did not show a significant difference (Figure 6B, 24 h: $p > 0.999$; 48 h: $p > 0.999$; 72 h: $p = 0.547$). Likewise, the SW1088MTAP^{+/+} cells did not exhibit distinct proliferation rates (Figure 6C, $p > 0.05$) and doubling time (Figure 6D, 24 h: $p = 0.700$; 48 h: $p = 0.885$; 72 h: $p = 0.885$) when compared with the control clone (SW1088LB). Together, these results suggest that the MTAP gene alone does not modulate cell proliferation.

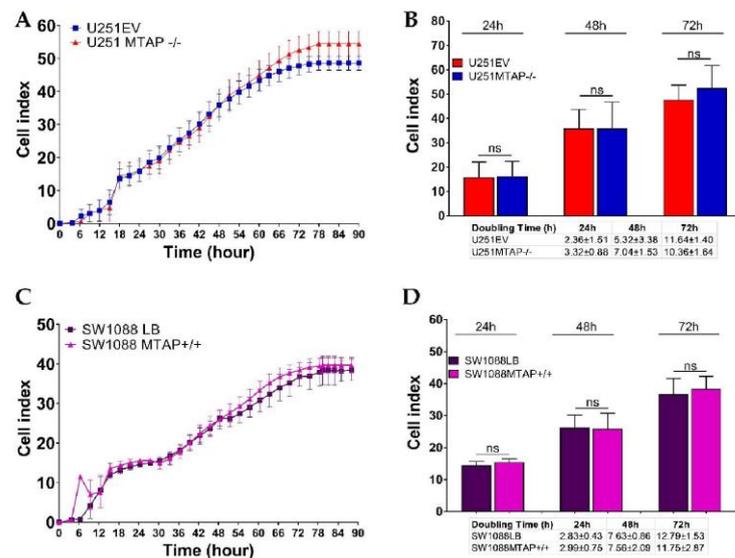


Figure 6. Dynamic monitoring of cell proliferation using impedance technology. Cell index values representative for U251MTAP^{-/-} vs. U251EV (A) and SW1088MTAP^{+/+} vs. SW1088LB (C) measured by the Real Time Cell Analysis (RTCA) assay for 90 h. Plot representative of cell index and doubling time at 24, 48, and 72 h for U251MTAP^{-/-} vs. U251EV (B) and SW1088MTAP^{+/+} vs. SW1088LB (D). Plot representative of three independent experiments. Student t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *ns*: not significant.

3.5. Loss of MTAP Gene is Not Associated with Cell Migration and Invasion

To investigate whether the loss of MTAP could affect glioma cell motility and invasiveness, we used the transwell cell migration assay (Figure 7A,B). U251MTAP^{-/-} cells promoted decreased ability of migration compared with U251EV by 10% (U251MTAP^{-/-}: 552.5 ± 205.3 vs. U251EV: 614.2 ± 223) (Figure 7A, $p > 0.999$), while the overexpressed clone SW1088MTAP^{+/+} showed an increase in migration ability about of 19% (SW1088LB: 557.8 ± 40.8 vs. SW1088MTAP^{+/+}: 687.6 ± 138.1) (Figure 7B, $p = 0.400$). Regarding the invasive properties of edited cells, as shown in Figure 7C, U251EV cells (601.7 ± 201.6) exhibited an 8% greater invasion compared to U251MTAP^{-/-} (553.5 ± 92.1), yet it was not statistically

significant ($p = 0.857$). Likewise, an increase of SW1088MTAP^{+/+} invasion was observed in ~12% (SW1088MTAP^{+/+}: 264.3 ± 50.7 vs. SW1088LB: 230.7 ± 31.9) compared to SW1088LB cell, also not statistically significant (Figure 7D, $p = 0.628$). Moreover, we obtained similar results when comparing U251MTAP^{-/-} and SW1088MTAP^{+/+} with U251WT and SW1088WT parental controls, respectively (data not shown).

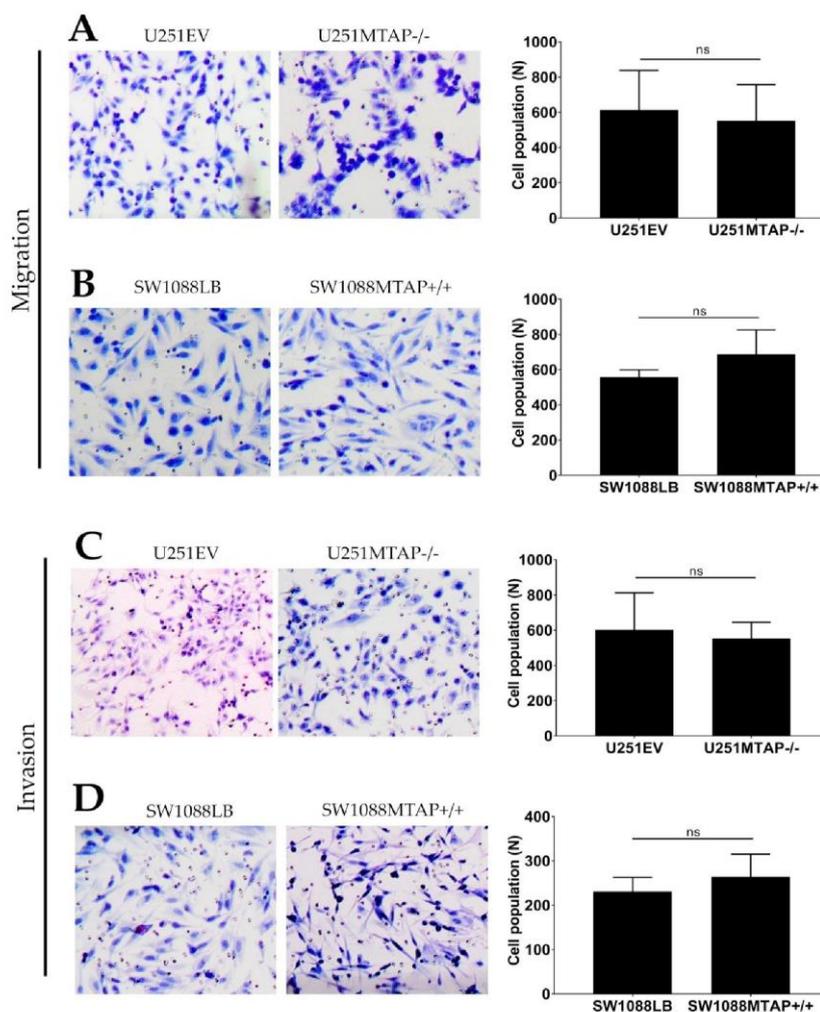


Figure 7. *MTAP* gene does not modulate migration and invasion abilities. Migration potential in both clone cell lines U251MTAP^{-/-} (A) and SW1088MTAP^{+/+} (B) compared to controls (U251EV and SW1088LB) measured by Transwell assays and expressed as relative cell population. Transmembrane invasion assay of U251MTAP^{-/-} (C) and SW1088MTAP^{+/+} (D) compared to controls (U251EV and SW1088LB). Quantification of migrated and invaded cells numbers per field. A minimum of 10 fields of two separate wells within each experiment were analyzed. The graphs represent data from three separate experiments. Student t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant.

Next, to support in vitro results, we evaluated the differential expression of 24 genes associated with invasion and migration processes. Only two of these genes were differently expressed in the U251 MTAP gene-edited cell line compared to U251EV cells (Supplementary Figure S2A). The *FN1* gene was found to be upregulated ($\log_2FC = 2.26$; $p = 0.0006$) and, inversely, *MAPK10* was found downregulated ($\log_2FC = -3.28$; $p < 0.0001$) in U251MTAP^{-/-} compared to U251EV (Supplementary Figure S2C). Furthermore, no differential expression was found between SW1088MTAP^{+/+} and control (Supplementary Figure S2C).

4. Discussion

In the present study, we evaluated *MTAP* expression in a large series of gliomas. Moreover, by using a genome edition gain- or loss-of *MTAP*-function approach in glioma cell lines, we explored *MTAP* biological impact on gliomas. We observed that, despite the frequent loss of *MTAP* expression in high-grade gliomas, *MTAP* was not associated with a worse outcome, and the in vitro models showed that *MTAP* does not affect cell line proliferation, invasion, and migration.

Initially, using an in silico approach, we showed that 48% (168/350) of gliomas had 9p21 locus deleted, and this deletion was directly associated with reduced *MTAP* expression. In fact, Zhao and Zhao in a tumor suppressor pan-cancer study reported the association between copy number loss (9p21) and reduced *MTAP* mRNA expression [49]. In addition, the homozygous deletion of 9p21 locus was identified to be significantly associated with a decrease of *MTAP* (mRNA and protein) expression levels [50]. This region of the human genome is especially interesting because *MTAP* is located close to a fragile site [51]. The deletion of this region usually causes co-deletion of *MTAP* and some classic and well-known tumor suppressor genes such as *CDKN2A/B* [52]. The cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) and the cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (*CDKN2B*) genes both encode putative regulators of cyclin-dependent kinases on chromosome 9p21 that could lead to uncontrolled cell proliferation and have been associated with poor prognosis in many cancer types included gliomas [23,53–55]. The 9p21 chromosomal region deletion is rare in grade I but frequent in grade IV glioma [39]. Our findings, in combination with the detection of other biomarkers, show *CDKN2A/B* could be used to predict 9p21 deletion and to stratify patients for stricter surveillance. By analyzing the TCGA-GBM dataset, we also observed that deletion, rather than *MTAP* promoter methylation, is associated with *MTAP* mRNA expression. Our results contrast with a recent study that found a significant association of *MTAP* methylation with gene expression [40]. However, Hansen et al. observed a very low coefficient of determination (R^2) (0.19) with a low correlation coefficient (R) value (0.44) clearly below the values considered as strong correlation (>0.6); therefore, caution should be taken in interpreting the reported correlation between DNA promoter methylation and *MTAP* expression described [40].

We then evaluated *MTAP* expression profile in accordance with the molecular subtype of glioblastomas described by Verhaak et al. [56] and Noushmehr et al. [16]. When using the TCGA-GBM dataset, we observed that *MTAP* loss of expression was more pronounced within the classical subtype (65.2%), corroborating previous reports that patients with classical subtype are characterized by *CDKN2A* gene deletion that is contiguous with the *MTAP* gene [26]. On the other hand, only 7.4% of the G-CIMP glioblastomas showed loss of *MTAP*, which is associated with secondary glioblastoma, tumor-harboring mutation of the *IDH1* gene, and lesions that progressed from LGG [16,57,58].

In glioma cell lines, we observed loss of *MTAP* in high-grade glioma cells, contrasting with low-grade glioma (40% vs. 0%). Interestingly, there was no loss of *MTAP* expression in pediatric GBM cell lines, whereas 50% (4/8) of adult GBM cell lines presented the loss of expression. These findings are in line with the less frequent (10–19%) 9p21 locus deletion event in pediatric HGG cases [8,59].

We further characterized *MTAP* expression by IHC, and we sought to associate it with its prognostic value. We previously reported that *MTAP* loss occurs in less than 15% of pilocytic astrocytomas (WHO grade I) [42]. Herein, we extended the immunohistochemistry analysis to a large set of diffuse infiltrative astrocytomas and observed association between loss of *MTAP* expression and malignancy

grade of gliomas. This result is in line with the report by Suzuki et al. [60] that identified the high frequency of *MTAP* deletion (60%) in glioblastoma series but rare presence in low-grade glioma [39,42]. Differently, in glioma cell lines, the loss of *MTAP* for pediatric glioblastoma (54.8%) was higher than in adult glioblastoma (45.6%) series. This finding was unexpected and may suggest that our series of pediatric GBM harbored histological characteristics such as those described in the receptor tyrosine kinases (RTK) II classic subgroup. These tumors exhibit features of copy number alterations of adult glioblastomas [8,61]. In a recent study, Frazão et al. [39] identified, in a series of pediatric gliomas, rare episodes of deletion in grade I glioma (12.2%) but frequent 9p21 deletion in high-grade glioma (62.5%). These results point to the correlation of *MTAP* deficiency with increased malignancy and histological subtype of gliomas [11,38,42,50,60].

Despite the frequent loss of expression associated with higher-grade lesions, when evaluating its clinical impact in our HGG and adult GBM cases, the loss of *MTAP* was surprisingly correlated with a better prognosis. One hypothesis that may explain this fact is that patients diagnosed with the classical subtype (frequent chromosome 9p deletion) presented better survival after intensive therapy (chemotherapy/radiotherapy) [56]. Our dataset is composed of patients with primary GBM characteristics (median age of 59 years, *IDH1*-mutated in 3.9%) with 79% (287/363) having undergone chemo or radiotherapy treatment, corroborating this result. In addition, through the bioinformatics approach, we did not observe any association of *MTAP* expression/deletion with overall survival ($p = 0.942$) and disease-free survival ($p = 0.230$) from the TCGA-GBM dataset. These results are not in accordance with Hansen et al. [40], which also analyzed the TCGA-GBM dataset and reported that *MTAP*-deleted cases presented worse disease-free survival (DFS) when compared to *MTAP*-normal patients. The lack of accuracy of DFS in GBM prognostic evolution, particularly outside a clinical trial assessment, is already known; therefore, overall survival (OS) is the most used criterion. When analyzing the same TCGA GBM dataset, we observed that *MTAP*-deleted patients did not show a worse OS when compared with *MTAP*-normal patients. Additionally, in agreement with Hansen et al. [40], we performed the DFS analysis of the same GBM dataset, considering the gold standard DFS endpoints (7), namely relapse and death events, different to the study by Hansen that only considered relapse and censored the events of death. The results also showed a lack of association between *MTAP* deletion and GBM patients' prognosis.

Our NanoString Pan-Cancer Panel analysis of *MTAP* gene-edited cell lines showed a significantly altered expression of genes associated with RAS/MAPK/PI3K-AKT and apoptosis pathways after *MTAP* gene knockout. Signaling by these pathways governs fundamental physiological processes, such as cell proliferation, differentiation, metabolism, cell death, and survival [62–64]. Out of nine genes differentially expressed in our study, five are included in the PI3K-AKT pathway, with three of them—*FN1*, *NGFR*, and *THBS1*—being associated with tumor progression [65–68]. Besides, upregulated *ANGPT1* and downregulated *CO11A1* are related to a better prognosis in lung cancer metastasis and proliferation in colorectal cancer [68,69]. Another gene, *TNFSF10*, was identified as upregulated in U251MTAP^{-/-}. This gene is frequently associated with the pro-apoptotic process by caspase 8 activation [70,71]. Curiously, only two genes, *GPC4* and *IL13RA2*, showed altered expression for SW1088MTAP^{+/+} cell line when compared to the control. These two genes exhibit differential expression and controversial function in various tumors acting as tumor promoters and inhibitors in a cancer type-specific manner [72–75].

Importantly, in U251MTAP^{-/-} and SW1088MTAP^{+/+} edited glioma cells, we showed that *MTAP* does not regulate glioma cell proliferation, migration, and invasion mechanisms, major cancer biological features of classic tumor suppressor genes. The results are consistent with the ones observed in our mRNA expression analysis obtained by the Pan-Cancer Pathway Panel assay. For these genes, significant differences were observed only for *FN1* and *MAPK10* between U251MTAP^{-/-} and U251EV without difference for other genes evaluated. A recent study with prostate cancer cells silenced for *MTAP* also showed similar growth rates to controls [33]. Furthermore, it was observed in hepatocellular carcinoma that the re-expression of *MTAP* did not change the proliferation rates when compared to

mock controls [28]. In gliomas, a recent study showed compelling data that MTAP loss is responsible for epigenetic remodeling and stemness properties [40]. The comparison of the present study with Hansen et al. [40] shows an important limitation related to culture systems. Our findings were obtained from 2D monolayer cultures, a high-serum adherent culture system that failed to maintain glioma stem-like subpopulation of cells and overrepresented only neoplastic cells [76]. We highlight that the process of in vitro culturing of GBM cells is fraught with challenges [77]. Although Hansen and colleagues provided the first evidence for relevance of MTAP loss in stemness-induction in GBM, their study also failed to account for a wide range of factors known to influence tumor growth, migration, invasion, and resistance to therapy. Therefore, for now, despite efforts, there is a lack of satisfactory methods for detailed monitoring of molecular and cellular determinants of tumor growth in patients as well as ideal in vitro systems for modeling of these processes [77]. Thus, additional studies with implementation of new culture models that better recapitulate the complex reality of glioma growing in situ are warranted to address this topic.

MTAP has been reported as an important therapeutic regulator. It may contribute to selective therapy with thiopurines in combination with MTA in MTAP-deleted tumors as a strategy to induce selective cell death [19,40,78]. However, in the context of treatment strategy, MTAP status as a factor of molecular vulnerability to increase the efficacy of treatment in patients with glioma should be further studied with caution. Our data provide arguments towards the lack of strong biological importance of MTAP in gliomagenesis. Clearly, a better understanding of the molecular changes of MTAP-depleted cells is needed to exploit this direct and indirect molecular vulnerability, increasing the efficacy of treatment in patients with glioma.

In summary, the present work showed that loss of MTAP expression is a frequent event in high-grade gliomas. In silico and in vitro models provided evidences towards the lack of strong biological importance of MTAP in gliomas. This study also showed that, despite the frequent loss of MTAP, it does not have a clinical impact in survival and does not act as a canonic tumor suppressor gene in gliomas.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/492/s1>. Table S1: Histological diagnosis of established and primary cell lines; Table S2: Genes differentially expressed post-MTAP gene-editing (U251MTAP^{-/-}). Table S3: List of genes differentially expressed post-MTAP gene editing (SW1088MTAP^{+/+}); Supplementary Figure S1: Generation of MTAP^{-/-} (U251) and MTAP^{+/+} (SW1088) cells by CRISPR/Cas9 and Lentiviral technology; Supplementary Figure S2: Superimposed box plot demonstrates average of the log2 gene expression of 24 Pan-Cancer Pathway panel genes across U251MTAP^{-/-} (A) and SW1088MTAP^{+/+} (B) cell lines. (C) List of the 24 genes differentially expressed in gene-edited cell lines.

Author Contributions: W.P.d.M.—Conception or design of the work; acquisition, analysis, and interpretation of data; Drafting the work; Final approval; V.A.O.S.—Critical review; Drafting the work; Final approval. I.N.F.G.—Analysis, and interpretation of data, Final approval; M.N.R.—Analysis, and interpretation of data, Final approval; M.L.C.S.—Acquisition of data, interpretation of data, Final approval; A.C.C.—Acquisition, analysis, and interpretation of data, Final approval; A.L.V.A.—Acquisition of data, Final approval; M.M.—Analysis of data, final approval; G.C.A.—analysis, and interpretation of data; final approval; L.S.d.S.—Acquisition, analysis, and interpretation of data, Final approval; A.P.B.—Sample collection; interpretation of data; final approval. L.N.—Sample collection; Critical review; Final approval. C.C.—Sample collection; Final approval. I.W.d.C.—Sample collection; Final approval. G.N.M.H.—Sample collection; Final approval. C.J.—Sample collection; Critical review; Final approval; L.T.B.—Acquisition, analysis, and interpretation of data; Drafting the work; Final approval. R.M.R. Corresponding author)—Conception or design of the work; interpretation of data; Drafting the work; Supervision of study; Final approval. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Menezes W.P. and Alves A.L.V. was a recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship and is recipient of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) fellowships (2016/06833-2 and 2016/18907-0). Gomes INF was a recipient of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) fellowship (2017/22305-9). Rosa MN was a recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship. Spina MLC was a recipient of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellowships (100707/2014-9, 116477/2014-8, 1282245/2014-0). Bidinotto LT was recipient of the Universal/CNPq grant (472447/2013-0). This study was supported by grants from the Barretos Cancer Hospital and by Public Ministry of Labor Campinas (Research, Prevention and Education of Occupational Cancer). Reis RM acknowledges the support of CNPq. Chris Jones acknowledges support from the National Institute for Health Research (NIHR) Biomedical Research

Center at the Royal Marsden and the Institute of Cancer Research in London. The CNPq, FAPESP and NIHR grants were responsible for the purchase of reagents used in data collection, described in manuscript (commercial Tissue Microarray (TMA), reagents utilized for making TMA, Medium reagents, cell lines acquisition, western blot and RT-qPCR reagents) analysis (antibody and immunohistochemistry reagents) and interpretation (fellowships).

Acknowledgments: We thank Barretos Cancer Hospital and Public Ministry of Labor (Research, Prevention, and Education of Occupational Cancer Project), Campinas, Brazil, for partially funding the present for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil). We thank the nucleus of support to the researcher for assisting in the analysis of statistical data. We thank the macrovector / Freepik and the New England Journal of Medicine by design the images used in the development of the graphic abstract.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

Appendix A.1. Cell Lines

One cell line derived from normal astrocytes (NHA), seven primary glioma cell lines, and 11 human glioma cell lines were evaluated. Human glioma cell lines were as follows: U251 (obtained from Costello Laboratory), GAMG (obtained from DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), RES259, SF188, UW479, and KNS42 (obtained from Bax et al. [79]), A172, U87MG, SW1088, SW1783, and T98G (obtained from ATCC, American Type Culture Collection), NHA (obtained from The European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). NHA, pediatric, and adult glioma cell lines (RES259, SF188, UW479, KNS42, U251, GAMG, A172, U87MG, SW1088, SW1783, and T98G) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO®, Paisley, Scotland, UK). Cell culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO®, Paisley, Scotland, UK) and 1% penicillin-streptomycin (P/S) (GIBCO®, Paisley, Scotland, UK). Primary short-term and immortalized glioma cell lines (HCB27, HCB28, HCB18, HCB149, HCB29, HCB2, and HCB151) established at Hospital de Cancer de Barretos, Brazil [80,81] were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% P/S. All cell lines were checked for the absence of mycoplasma infection. Authentication of cell lines was performed and confirmed by short tandem repeat (STR) DNA typing according to the International Reference Standard for Authentication of Human Cell Lines.

Appendix A.2. Gene Editing

Appendix A.2.1. CRISPR/Cas9-Mediated MTAP Gene Editing

The U251 cell line was transfected with CRISPR/Cas9 KO (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) according to the modified supplier's protocol. Briefly, in a six-well tissue culture plate, 2.5×10^5 cells were seeded in 1 mL of DMEM medium supplemented with FBS at 10% per well, at 37 °C and supplemented with 5% CO₂ per 24 h until reaching 70–90% of confluence. Next, DMEM medium was removed, and 200 µL of opti-MEM was added into wells and cultivated at 37 °C and 5% of CO₂ until the transfection solutions were ready. For solution A, 1.5 µg of MTAP CRISPR/Cas9 KO plasmid (h) (sc-406223) and 1.5 µg of MTAP HDR Plasmid (h) (sc-406223-HDR) or 3.0 µg of Control CRISPR/Cas9 Plasmid (sc-418922) were added into opti-MEM medium to bring the final volume to 150 µL. For solution B, 15 µL of UltraCruz Transfection Reagent (sc-395739) was added into the opti-MEM medium to a total of 150 µL. The Plasmid DNA solution (Solution A) was then added dropwise directly to the UltraCruz Transfection Reagent (Solution B), vortexed, and incubated for 20 min at room temperature (Solution C). Then, 300 µL of solution C was added into each well and incubated for 72 h under conditions normally used to culture the cells. At 72 h post-transfection, the medium was aspirated, and DMEM medium containing 10% of FBS and 5 µg/mL of puromycin antibiotic was added (Santa Cruz, Dallas, USA #CAS 58-58-2) for 7 days. Every 3 days, the medium was aspirated, and new freshly selective media were added into well. The success of MTAP CRISPR/Cas9 KO Plasmid and HDR Plasmid was confirmed by the detection of the red fluorescent protein (RFP) via fluorescent microscopy

and Western blotting assay. The stably deleted cell line was designated as U251 MTAP^{-/-} and U251 EV for empty vector control as well as the wild type parental control (U251 WT).

Appendix A.2.2. Cell Transduction and Generation of MTAP Overexpressing Cell Line

The lentivirus for *MTAP* overexpression (MTAP Lentivirus Human, No. #LVP712487) and the control lentivirus (pLenti-III-CMV-GFP-2A-Puro-Blank Control Lentiviral Vector, No. #LV590) were obtained commercially from Applied Biological Materials (ABM Inc.[®], Richmond, BC, Canada). Stable cell lines were generated by transducing the MTAP or the Blank control (without insert) and were selected with 25 µg/mL puromycin according to the supplier's protocol. First, to select the multiplicity of infection (MOI), the green fluorescent protein (GFP) control (LV006) was transduced into the SW1088 cell line cultured in a 96-well tissue culture plate (TPP[®], Lausanne, Vaud, Switzerland) at a MOI of 2, 4, 6, 8, or 10. The success of GFP expression was observed under a fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Hesse, Germany) after 48 h. An MOI=10 was selected for subsequent experiments, which was adequate for sufficient genetic overexpression in the infected cells with minimum damage. After that, 1×10^4 cells (SW1088) were seeded in a 96-well tissue culture plate in 100 µL of DMEM medium supplemented with FBS at 10% per well at 37 °C and supplemented with 5% CO₂ overnight until reaching 70–80% of confluence. Next, the DMEM medium was removed from wells and replaced with 150 µL of transduction mixture [Viral Plus transduction enhancer (G968) diluted 1:100 into MTAP Lentiviral vector, #LVP712487 or Puro-Blank Lentivirus; #LV590; ABM Inc.[®], Richmond, BC, Canada] following incubation of the 96-plate at 37 °C with 5% CO₂ overnight. After 72 h, the DMEM medium was removed and replaced with 100 µL of complete medium. Stably transfected cells were selected by the addition of 25 µg/mL puromycin to the medium, which was changed every 3 days. The selection was terminated after 7 days when the uninfected control cells were completely dead. The stably expressing cell lines were designated as SW1088 MTAP^{+/+} and SW1088 LB for lentivirus blank control, beyond the wild type cell line (SW1088 WT). The infected cells were selected using puromycin antibiotic (25 µg/mL) for 10 days, and stable expression was confirmed by Western blot.

References

- Ostrom, Q.T.; Gittleman, H.; Truitt, G.; Boscia, A.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol.* **2018**, *20*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ganau, L.; Paris, M.; Ligarotti, G.K.; Ganau, M. Management of Gliomas: Overview of the Latest Technological Advancements and Related Behavioral Drawbacks. *Behav. Neurol.* **2015**, *2015*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Appin, C.L.; Brat, D.J. Molecular genetics of gliomas. *Cancer J.* **2014**, *20*, 66–72. [[CrossRef](#)]
- Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [[CrossRef](#)]
- Omuro, A.; DeAngelis, L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. *JAMA* **2013**, *310*, 1842–1850. [[CrossRef](#)]
- Knizhnik, A.V.; Roos, W.P.; Nikolova, T.; Quiros, S.; Tomaszowski, K.H.; Christmann, M.; Kaina, B. Survival and death strategies in glioma cells: Autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55665. [[CrossRef](#)]
- Sturm, D.; Bender, S.; Jones, D.T.; Lichter, P.; Grill, J.; Becher, O.; Hawkins, C.; Majewski, J.; Jones, C.; Costello, J.F.; et al. Paediatric and adult glioblastoma: Multifactorial (epi)genomic culprits emerge. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 92–107. [[CrossRef](#)]
- Louis, D.N.; Perry, A.; Burger, P.; Ellison, D.W.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Aldape, K.; Brat, D.; Collins, V.P.; Eberhart, C.; et al. International Society of Neuropathology–Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* **2014**, *24*, 429–435. [[CrossRef](#)]

10. Killela, P.J.; Reitman, Z.J.; Jiao, Y.; Bettegowda, C.; Agrawal, N.; Diaz, L.A., Jr.; Friedman, A.H.; Friedman, H.; Gallia, G.L.; Giovannella, B.C.; et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 6021–6026. [[CrossRef](#)]
11. Bidinotto, L.T.; Torrieri, R.; Mackay, A.; Almeida, G.C.; Viana-Pereira, M.; Cruvinel-Carloni, A.; Spina, M.L.; Campanella, N.C.; Pereira de Menezes, W.; Clara, C.A.; et al. Copy Number Profiling of Brazilian Astrocytomas. *G3* **2016**, *6*, 1867–1878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Eckel-Passow, J.E.; Lachance, D.H.; Molinaro, A.M.; Walsh, K.M.; Decker, P.A.; Sicotte, H.; Pekmezci, M.; Rice, T.; Kosel, M.L.; Smirnov, I.V.; et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2499–2508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Foote, M.B.; Papadopoulos, N.; Diaz, L.A., Jr. Genetic Classification of Gliomas: Refining Histopathology. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 9–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nguyen, H.N.; Lie, A.; Li, T.; Chowdhury, R.; Liu, F.; Ozer, B.; Wei, B.; Green, R.M.; Ellingson, B.M.; Wang, H.J.; et al. Human TERT promoter mutation enables survival advantage from MGMT promoter methylation in IDH1 wild-type primary glioblastoma treated by standard chemoradiotherapy. *Neuro-Oncol.* **2017**, *19*, 394–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Arita, H.; Yamasaki, K.; Matsushita, Y.; Nakamura, T.; Shimokawa, A.; Takami, H.; Tanaka, S.; Mukasa, A.; Shirahata, M.; Shimizu, S.; et al. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathol. Commun.* **2016**, *4*, 79. [[CrossRef](#)]
16. Noushmehr, H.; Weisenberger, D.J.; Diefes, K.; Phillips, H.S.; Pujara, K.; Berman, B.P.; Pan, F.; Pelloski, C.E.; Sulman, E.P.; Bhat, K.P.; et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 510–522. [[CrossRef](#)]
17. Savarese, T.M.; Crabtree, G.W.; Parks, R.E. 5'-methylthioadenosine phosphorylase—I. *Biochem. Pharmacol.* **1981**, *30*, 189–199. [[CrossRef](#)]
18. Traweek, S.T.; Riscoe, M.K.; Ferro, A.J.; Brazier, R.M.; Magenis, R.E.; Fitch, J.H. Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in acute leukemia: Pathologic, cytogenetic, and clinical features. *Blood* **1988**, *71*, 1568–1573. [[CrossRef](#)]
19. Tang, B.; Lee, H.O.; An, S.S.; Cai, K.Q.; Kruger, W.D. Specific Targeting of MTAP-Deleted Tumors with a Combination of 2'-Fluoroadenine and 5'-Methylthioadenosine. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 4386–4395. [[CrossRef](#)]
20. Chaturvedi, S.; Hoffman, R.M.; Bertino, J.R. Exploiting methionine restriction for cancer treatment. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *154*, 170–173. [[CrossRef](#)]
21. Batova, A.; Diccianni, M.B.; Nobori, T.; Vu, T.; Yu, J.; Bridgeman, L.; Yu, A.L. Frequent deletion in the methylthioadenosine phosphorylase gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: Strategies for enzyme-targeted therapy. *Blood* **1996**, *88*, 3083–3090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mirebeau, D.; Acquaviva, C.; Suci, S.; Bertin, R.; Dastugue, N.; Robert, A.; Boutard, P.; Mechinaud, F.; Plouvier, E.; Otten, J.; et al. The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica* **2006**, *91*, 881–885.
23. Illei, P.B.; Rusch, V.W.; Zakowski, M.F.; Ladanyi, M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 2108–2113. [[PubMed](#)]
24. Huang, H.Y.; Li, S.H.; Yu, S.C.; Chou, F.F.; Tzeng, C.C.; Hu, T.H.; Uen, Y.H.; Tian, Y.F.; Wang, Y.H.; Fang, F.M.; et al. Homozygous deletion of MTAP gene as a poor prognosticator in gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 6963–6972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nobori, T.; Szinai, I.; Amos, D.; Parker, B.; Olopade, O.I.; Buchhagen, D.L.; Carson, D.A. Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in human non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1098–1101. [[PubMed](#)]
26. Christopher, S.A.; Diegelman, P.; Porter, C.W.; Kruger, W.D. Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 6639–6644.
27. Behrmann, I.; Wallner, S.; Komyod, W.; Heinrich, P.C.; Schuierer, M.; Buettner, R.; Bosserhoff, A.K. Characterization of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 683–690. [[CrossRef](#)]

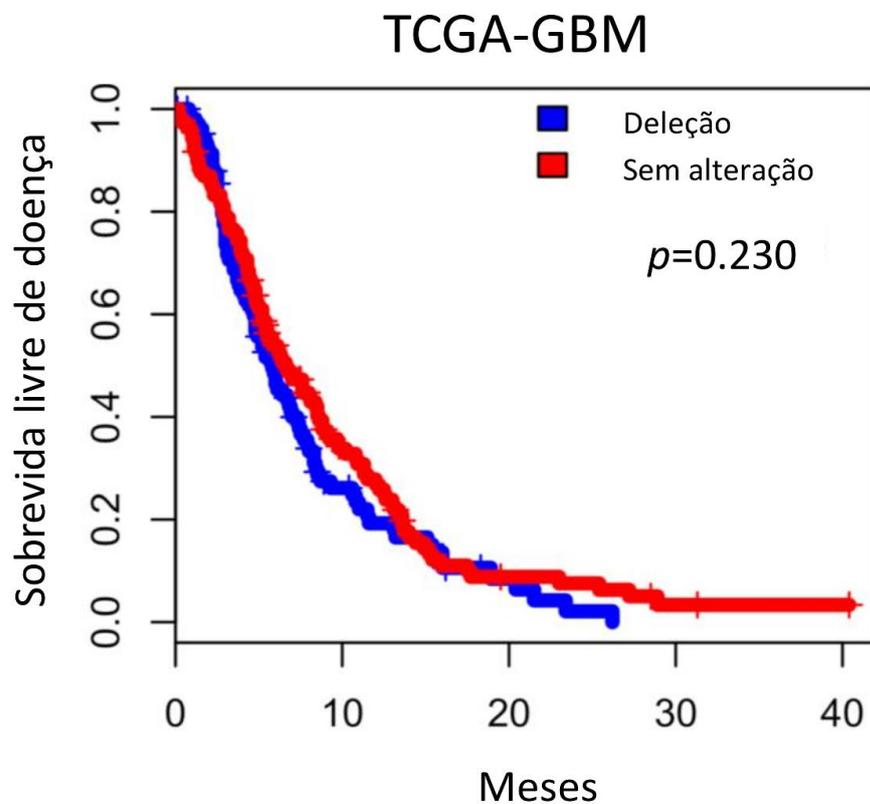
28. Hellerbrand, C.; Muhlbauer, M.; Wallner, S.; Schuierer, M.; Behrmann, I.; Bataille, F.; Weiss, T.; Scholmerich, J.; Bosserhoff, A.K. Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 64–72. [[CrossRef](#)]
29. Kirovski, G.; Stevens, A.P.; Czech, B.; Dettmer, K.; Weiss, T.S.; Wild, P.; Hartmann, A.; Bosserhoff, A.K.; Oefner, P.J.; Hellerbrand, C. Down-regulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) induces progression of hepatocellular carcinoma via accumulation of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA). *Am J. Pathol.* **2011**, *178*, 1145–1152. [[CrossRef](#)]
30. Tang, B.; Kadariya, Y.; Chen, Y.; Slifker, M.; Kruger, W.D. Expression of MTAP inhibits tumor-related phenotypes in HT1080 cells via a mechanism unrelated to its enzymatic function. *G3* **2014**, *5*, 35–44. [[CrossRef](#)]
31. Basu, I.; Cordovano, G.; Das, I.; Belbin, T.J.; Guha, C.; Schramm, V.L. A transition state analogue of 5'-methylthioadenosine phosphorylase induces apoptosis in head and neck cancers. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21477–21486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Basu, I.; Locker, J.; Cassera, M.B.; Belbin, T.J.; Merino, E.F.; Dong, X.; Hemeon, L.; Evans, G.B.; Guha, C.; Schramm, V.L. Growth and metastases of human lung cancer are inhibited in mouse xenografts by a transition state analogue of 5'-methylthioadenosine phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 4902–4911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bistulfi, G.; Affronti, H.C.; Foster, B.A.; Karasik, E.; Gillard, B.; Morrison, C.; Mohler, J.; Phillips, J.G.; Smiraglia, D.J. The essential role of methylthioadenosine phosphorylase in prostate cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 14380–14393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jeon, H.; Kim, J.H.; Lee, E.; Jang, Y.J.; Son, J.E.; Kwon, J.Y.; Lim, T.G.; Kim, S.; Park, J.H.; Kim, J.E.; et al. Methionine deprivation suppresses triple-negative breast cancer metastasis in vitro and in vivo. *Oncotarget* **2016**, *7*, 67223–67234. [[CrossRef](#)]
35. Casero, R.A., Jr.; Murray Stewart, T.; Pegg, A.E. Polyamine metabolism and cancer: Treatments, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 681–695. [[CrossRef](#)]
36. Zhong, Y.; Lu, K.; Zhu, S.; Li, W.; Sun, S. Characterization of methylthioadenosin phosphorylase (MTAP) expression in colorectal cancer. *Artif. Cellsnanomedicineand Biotechnol.* **2018**, *46*, 2082–2087. [[CrossRef](#)]
37. Nobori, T.; Karras, J.G.; Della Ragione, F.; Waltz, T.A.; Chen, P.P.; Carson, D.A. Absence of methylthioadenosine phosphorylase in human gliomas. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 3193–3197.
38. Olopade, O.I.; Jenkins, R.B.; Ransom, D.T.; Malik, K.; Pomykala, H.; Nobori, T.; Cowan, J.M.; Rowley, J.D.; Diaz, M.O. Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2523–2529.
39. Frazao, L.; do Carmo Martins, M.; Nunes, V.M.; Pimentel, J.; Faria, C.; Miguens, J.; Sagarrabay, A.; Matos, M.; Salgado, D.; Nunes, S.; et al. BRAF V600E mutation and 9p21: CDKN2A/B and MTAP co-deletions—Markers in the clinical stratification of pediatric gliomas. *Bmc Cancer* **2018**, *18*, 1259. [[CrossRef](#)]
40. Hansen, L.J.; Sun, R.; Yang, R.; Singh, S.X.; Chen, L.H.; Pirozzi, C.J.; Moure, C.J.; Hemphill, C.; Carpenter, A.B.; Healy, P.; et al. MTAP Loss Promotes Stemness in Glioblastoma and Confers Unique Susceptibility to Purine Starvation. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 3383–3394. [[CrossRef](#)]
41. Huang, T.; Li, S.; Yang, Z.; Liu, J.; Han, Y. Loss of Heterozygosity of 9p Is Associated with Poorer Survival in Patients with Gliomas. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 6407–6412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Becker, A.P.; Scapulatempo-Neto, C.; Menezes, W.P.; Clara, C.; Machado, H.R.; Oliveira, R.S.; Neder, L.; Reis, R.M. Expression of Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) in Pilocytic Astrocytomas. *Pathobiology* **2015**, *82*, 84–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Simms, D.; Paul, E.; Cizdziel, P.E.; Piotr, C.N. Trizol: A new reagent for optimal single step of RNA. *Focus* **1993**, *15*, 532–535.
44. Batista, R.; Cruvinel-Carlioni, A.; Vinagre, J.; Peixoto, J.; Catarino, T.A.; Campanella, N.C.; Menezes, W.; Becker, A.P.; de Almeida, G.C.; Matsushita, M.M.; et al. The prognostic impact of TERT promoter mutations in glioblastomas is modified by the rs2853669 single nucleotide polymorphism. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 414–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Gaspar, N.; Marshall, L.; Perryman, L.; Bax, D.A.; Little, S.E.; Viana-Pereira, M.; Sharp, S.Y.; Vassal, G.; Pearson, A.D.; Reis, R.M.; et al. MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell gene signature. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9243–9252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 5. [[CrossRef](#)]
47. Wan, Y.-W.; Allen, G.I.; Liu, Z. TCGA2STAT: Simple TCGA data access for integrated statistical analysis in R. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 952–954. [[CrossRef](#)]
48. Waggott, D.; Chu, K.; Yin, S.; Wouters, B.G.; Liu, F.F.; Boutros, P.C. NanoStringNorm: An extensible R package for the pre-processing of NanoString mRNA and miRNA data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1546–1548. [[CrossRef](#)]
49. Zhao, M.; Zhao, Z. Concordance of copy number loss and down-regulation of tumor suppressor genes: A pan-cancer study. *Bmc Genom.* **2016**, *17* (Suppl. 7), 532. [[CrossRef](#)]
50. Crespo, I.; Tao, H.; Nieto, A.B.; Rebelo, O.; Domingues, P.; Vital, A.L.; Patino Mdel, C.; Barbosa, M.; Lopes, M.C.; Oliveira, C.R.; et al. Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: Impact on gene expression levels. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46088. [[CrossRef](#)]
51. Zhang, H.; Chen, Z.H.; Savarese, T.M. Codeletion of the genes for p16INK4, methylthioadenosine phosphorylase, interferon-alpha1, interferon-beta1, and other 9p21 markers in human malignant cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.* **1996**, *86*, 22–28. [[CrossRef](#)]
52. Su, C.Y.; Chang, Y.C.; Chan, Y.C.; Lin, T.C.; Huang, M.S.; Yang, C.J.; Hsiao, M. MTAP is an independent prognosis marker and the concordant loss of MTAP and p16 expression predicts short survival in non-small cell lung cancer patients. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2014**, *40*, 1143–1150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ueki, K.; Ono, Y.; Henson, J.W.; Efid, J.T.; von Deimling, A.; Louis, D.N. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 150–153. [[PubMed](#)]
54. Lopez, F.; Sampedro, T.; Llorente, J.L.; Hermsen, M.; Alvarez-Marcos, C. Alterations of p14 (ARF), p15 (INK4b), and p16 (INK4a) Genes in Primary Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* **2017**, *23*, 63–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Krasinskas, A.M.; Bartlett, D.L.; Cieply, K.; Dacic, S. CDKN2A and MTAP deletions in peritoneal mesotheliomas are correlated with loss of p16 protein expression and poor survival. *Mod Pathol* **2010**, *23*, 531–538. [[CrossRef](#)]
56. Verhaak, R.G.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P.; et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98–110. [[CrossRef](#)]
57. Malta, T.M.; de Souza, C.F.; Sabedot, T.S.; Silva, T.C.; Mosella, M.S.; Kalkanis, S.N.; Snyder, J.; Castro, A.V.B.; Nounshmehr, H. Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): Biological and clinical implications. *Neuro Oncol.* **2018**, *20*, 608–620. [[CrossRef](#)]
58. Turcan, S.; Rohle, D.; Goenka, A.; Walsh, L.A.; Fang, F.; Yilmaz, E.; Campos, C.; Fabius, A.W.; Lu, C.; Ward, P.S.; et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* **2012**, *483*, 479–483. [[CrossRef](#)]
59. Velázquez Vega, J.E.; Brat, D.J. Molecular-Genetic Classification of Gliomas and Its Practical Application to Diagnostic Neuropathology. In *Diffuse Low-Grade Gliomas in Adults*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017; pp. 73–100. [[CrossRef](#)]
60. Suzuki, T.; Maruno, M.; Wada, K.; Kagawa, N.; Fujimoto, Y.; Hashimoto, N.; Izumoto, S.; Yoshimine, T. Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system. *Brain Tumor Pathol.* **2004**, *21*, 27–34. [[CrossRef](#)]
61. Sturm, D.; Witt, H.; Hovestadt, V.; Khuong-Quang, D.A.; Jones, D.T.; Konermann, C.; Pfaff, E.; Tonjes, M.; Sill, M.; Bender, S.; et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 425–437. [[CrossRef](#)]
62. Vivanco, I.; Sawyers, C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 489–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Pearson, G.; Robinson, F.; Beers Gibson, T.; Xu, B.E.; Karandikar, M.; Berman, K.; Cobb, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **2001**, *22*, 153–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

64. Rubinfeld, H.; Seger, R. The ERK Cascade: A Prototype of MAPK Signaling. *Mol. Biotechnol.* **2005**, *31*, 151–174. [[CrossRef](#)]
65. Sun, Y.; Zhao, C.; Ye, Y.; Wang, Z.; He, Y.; Li, Y.; Mao, H. High expression of fibronectin 1 indicates poor prognosis in gastric cancer. *Oncol. Lett.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Zhou, X.; Hao, Q.; Liao, P.; Luo, S.; Zhang, M.; Hu, G.; Liu, H.; Zhang, Y.; Cao, B.; Baddoo, M.; et al. Nerve growth factor receptor negates the tumor suppressor p53 as a feedback regulator. *eLife* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Daubon, T.; Leon, C.; Clarke, K.; Andrique, L.; Salabert, L.; Darbo, E.; Pineau, R.; Guerit, S.; Maitre, M.; Dedieu, S.; et al. Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Wang, J.; Deng, L.; Huang, J.; Cai, R.; Zhu, X.; Liu, F.; Wang, Q.; Zhang, J.; Zheng, Y. High expression of Fibronectin 1 suppresses apoptosis through the NF- κ B pathway and is associated with migration in nasopharyngeal carcinoma. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 4502–4511.
69. Zhang, Z.; Fang, C.; Wang, Y.; Zhang, J.; Yu, J.; Zhang, Y.; Wang, X.; Zhong, J. COL1A1: A potential therapeutic target for colorectal cancer expressing wild-type or mutant KRAS. *Int. J. Oncol.* **2018**, *53*, 1869–1880. [[CrossRef](#)]
70. De Miguel, D.; Lemke, J.; Anel, A.; Walczak, H.; Martinez-Lostao, L. Onto better TRAILS for cancer treatment. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 733–747. [[CrossRef](#)]
71. Knight, M.J.; Riffkin, C.D.; Muscat, A.M.; Ashley, D.M.; Hawkins, C.J. Analysis of FasL and TRAIL induced apoptosis pathways in glioma cells. *Oncogene* **2001**, *20*, 5789–5798. [[CrossRef](#)]
72. Kirkpatrick, C.A.; Selleck, S.B. Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 1829–1832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Kaur, S.P.; Cummings, B.S. Role of glypicans in regulation of the tumor microenvironment and cancer progression. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *168*, 108–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Kawakami, K.; Kawakami, M.; Snoy, P.J.; Husain, S.R.; Puri, R.K. In vivo overexpression of IL-13 receptor alpha2 chain inhibits tumorigenicity of human breast and pancreatic tumors in immunodeficient mice. *J. Exp. Med.* **2001**, *194*, 1743–1754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Fujisawa, T.; Joshi, B.H.; Puri, R.K. IL-13 regulates cancer invasion and metastasis through IL-13Ralpha2 via ERK/AP-1 pathway in mouse model of human ovarian cancer. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 344–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Lee, J.; Kotliarova, S.; Kotliarova, Y.; Li, A.; Su, Q.; Donin, N.M.; Pastorino, S.; Purow, B.W.; Christopher, N.; Zhang, W.; et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 391–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Caragher, S.; Chalmers, A.J.; Gomez-Roman, N. Glioblastoma's Next Top Model: Novel Culture Systems for Brain Cancer Radiotherapy Research. *Cancers* **2019**, *11*. [[CrossRef](#)]
78. Bertino, J.R.; Waud, W.R.; Parker, W.B.; Lubin, M. Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity: Current strategies. *Cancer Biol.* **2011**, *11*, 627–632. [[CrossRef](#)]
79. Bax, D.A.; Little, S.E.; Gaspar, N.; Perryman, L.; Marshall, L.; Viana-Pereira, M.; Jones, T.A.; Williams, R.D.; Grigoriadis, A.; Vassal, G.; et al. Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5209. [[CrossRef](#)]
80. Martinho, O.O.R.; Miranda-Gonçalves, V.; Clara, C.; Almeida, J.R.; Carvalho, A.L.; Barata, J.T.; Reis, R.M. In Vitro and In Vivo Analysis of RTK Inhibitor Efficacy and Identification of Its Novel Targets in Glioblastomas. *Transl. Oncol.* **2013**, *6*, 187–196. [[CrossRef](#)]
81. Cruvinel-Carlioni, A.; Silva-Oliveira, R.; Torrieri, R.; Bidinotto, L.T.; Berardinelli, G.N.; Oliveira-Silva, V.A.; Clara, C.A.; de Almeida, G.C.; Martinho, O.; Squire, J.A.; et al. Molecular characterization of short-term primary cultures and comparison with corresponding tumor tissue of Brazilian glioblastoma patients. *Transl. Cancer Res.* **2017**, *6*, 332–345. [[CrossRef](#)]



Anexo K – Análise de sobrevida livre de doença



Análise de Kaplan-Meier para expressão de *MTAP* associado a sobrevida livre de doença para o dataset TCGA-GBM.