

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FERNANDA STAPENHORST FRANÇA

**Reprogramação metabólica e possíveis alvos terapêuticos em adenocarcinoma
pulmonar**

Porto Alegre

Março 2016

CIP - Catalogação na Publicação

França, Fernanda Stapenhorst
Reprogramação metabólica e possíveis alvos
terapêuticos em adenocarcinoma pulmonar / Fernanda
Stapenhorst França. -- 2016.
74 f.

Orientador: Fabio Klamt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. câncer de pulmão. 2. metabolismo energético. 3.
biomarcadores. I. Klamt, Fabio, orient. II. Título.

ÍNDICE

PREFÁCIO.....	IV
PARTE I.....	1
RESUMO	2
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVEATURAS	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Reprogramação metabólica	6
1.2. Câncer de pulmão	9
1.3. Reprogramação metabólica em CPNPC	10
1.4. Biomarcadores	11
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivos gerais	15
2.2. Objetivos específicos	15
PARTE II	16
3. ARTIGO CIENTÍFICO	17
PARTE III	61
4. DISCUSSÃO	61
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	66

PREFÁCIO

Esta dissertação de mestrado, intitulada “Reprogramação metabólica e possíveis alvos terapêuticos em adenocarcinoma pulmonar” será apresentada em três partes.

A primeira parte traz um resumo em português, um resumo em inglês, uma introdução sobre o assunto e os objetivos da dissertação. A segunda parte apresenta o artigo a ser submetido, contendo metodologias, resultados e discussão. A terceira parte da dissertação dispõe as considerações finais.

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Celular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PARTE I

RESUMO

O câncer de pulmão é a neoplasia maligna mais insidiosa da oncologia, sendo responsável pelo maior número de mortes relacionadas ao câncer no mundo. Oitenta e cinco por cento dos casos de câncer de pulmão são de não-pequenas células (CPNPC), onde sua maioria é adenocarcinoma. Apesar dos progressos nas pesquisas em câncer, o prognóstico de pacientes em estágios avançados permanece ruim, portanto faz-se necessária o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Nesse trabalho, focamos no metabolismo energético tumoral, o qual apresenta alto consumo de glicose e liberação de lactato mesmo na presença de oxigênio, o chamado Efeito Warburg. Outras vias metabólicas também encontram-se alteradas, processo conhecido como reprogramação metabólica. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é buscar possíveis marcadores tumorais e alvos terapêuticos envolvidos no metabolismo energético, através de uma abordagem que começa na bioinformática, de forma a prospectar candidatos a partir de uma vasta gama de genes envolvidos com o metabolismo. Foram selecionados os genes IDH1, LDHA e PYGB a partir de uma análise de enriquecimento gênico, os quais foram submetidos a análises de sobrevivência em bancos de dados de microarranjo. Em seguida, o nível de expressão das proteínas IDH1 e LDHA foi avaliado por imunohistoquímica em uma coorte clínica, onde pudemos observar um aumento na expressão de IDH1 em tumores em relação a tecidos pulmonares saudáveis. Ainda, em modelo celular, observamos que ambas as proteínas estavam aumentadas em células tumorais de adenocarcinoma pulmonar em relação a células saudáveis de pulmão. Ao combinar o inibidor de LDHA, oxamato, com cisplatina na linhagem de adenocarcinoma pulmonar A549, foi observado uma interação de sinergismo e, na linhagem pulmonar sadia NHBE, foi observado um antagonismo, de forma que essa abordagem se mostra promissora na terapêutica. Já

ao combinar o inibidor de IDH1, oxalomalato, com cisplatina na linhagem A549, foi observado um antagonismo. Assim, esse estudo demonstrou um possível papel de biomarcador para adenocarcinoma pulmonar para a enzima IDH1 e um possível papel terapêutico para a enzima LDHA.

ABSTRACT

Lung cancer is the most common kind of tumor, responsible for most of cancer-related deaths worldwide. Eighty five percent of lung cancer cases are non-small cell lung cancer (NSCLC), where most are classified as adenocarcinoma. Despite progresses made on cancer research, advanced-stage patients' prognosis remains low, hence new therapeutic approaches are necessary. On this work, we focused on tumor energetic metabolism, which is characterized by high glucose uptake and lactate release even on aerobic conditions, the so-called Warburg Effect. Other metabolic pathways are also altered, process known as metabolic reprogramming. Thus, the aim of this study is to seek for possible tumor biomarkers and therapeutic targets involved on energetic metabolism through a pipeline that begins with a bioinformatics approach, looking for three molecules from a wide range of metabolic genes. From there, we selected the genes of IDH1, LDHA and PYGB, on which we performed survival analyses from microarray databanks. Next, the protein expression of IDH1 and LDHA was assessed on a clinical cohort, where we observed an increased expression of IDH1 on tumors when compared to healthy lung tissue. Also, on a cellular model, we observed that both IDH1 and LDHA protein levels were increased on adenocarcinoma cell lines A549 and EKVX when comparing to healthy lung cells NHBE and SAEC. Combining LDHA inhibitor, oxamate, with cisplatin on A549, we observed a synergic interaction and, on NHBE, we observed an antagonism effect, showing that this therapeutic approach could be promising. However, when combining IDH1 inhibitor oxalomalate with cisplatin on A549, we observed an antagonism effect. Hence, this study showed a possible role as lung adenocarcinoma biomarker for IDH1, and a possible therapeutic target role for LDHA.

Lista de Abreviaturas

CPNPC: Câncer de pulmão de não-pequenas células

IDH1: Isocitrato desidrogenase 1

LDHA: Lactato desidrogenase A

PYGB: Glicogênio fosforilase cerebral

FdG: 2-deoxi-2-(¹⁸F)flúor-D-glicose

PET: Tomografia por Emissão de Pósitrons

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidermal

ALK: Cinase de linfoma anaplásico

TKI: Inibidor de tirosina cinase

HK2: Hexocinase 2

GLUT3: Transportador de glicose 3

PGK1: Fosfoglicerato cinase 1

PPP: Via das pentoses fosfato

TCA: Ciclo do ácido tricarboxílico

OXPPOS: Fosforilação oxidativa

War: Isoformas Warburg

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis

GEO: Gene Expression Omnibus

Kegg: Kyoto encyclopedia of genes and genomes

CI: Combination Index

1. INTRODUÇÃO

1.1 Reprogramação Metabólica

Nos primórdios dos estudos em bioquímica, antes mesmo de se entender sobre os mecanismos de fermentação, Louis Pasteur observou, em 1861, um fenômeno de extrema importância relacionado ao metabolismo de carboidratos. Realizando experimentos com levedura, ele reportou um maior consumo de açúcares na ausência de oxigênio, o que mais tarde foi chamado de Efeito Pasteur (Racker, 1974). Atualmente, sabemos que isso se traduz na inibição da glicólise – fenômeno que converte glicose a piruvato e então a lactato – na presença de oxigênio, de forma a direcionar o piruvato proveniente dessa reação para a mitocôndria, onde é oxidado a CO₂ e água. A partir desta descoberta, muito foi estudado sobre a relevância deste fenômeno em diversas patologias e, em 1926, Otto Warburg reportou que tumores sólidos realizavam a conversão de glicose a lactato mesmo na presença de oxigênio, reação intitulada de glicólise aeróbica, o que ficou então conhecido como Efeito Warburg (Warburg, 1930) (Figura 1). Mais tarde, essa descoberta levou Warburg à hipótese de que células tumorais apresentavam um metabolismo mitocondrial defeituoso (Warburg, 1956), o que foi muito contestado por outros cientistas (Weinhouse, 1956) e, com o tempo, foi provado que sua hipótese estava errada. Entretanto, por mais de 50 anos o Efeito Warburg foi ignorado, e poucos estudos focavam-se neste fenômeno.

Atualmente, observamos um papel fundamental da descoberta de Warburg na oncologia clínica através do uso da tomografia por emissão de pósitrons (PET) utilizando o análogo de glicose 2-deoxi-2-(¹⁸F)flúor-D-glicose (FdG). Essa técnica demonstrou um aumento na captação de glicose por parte dos tumores, de forma a

suprir sua demanda energética ao utilizar a glicólise aeróbica. Utilizada atualmente na clínica, a FdG-PET permite a detecção de cânceres primários e metastáticos devido a esse aumento de captação de glicose em células tumorais (Gatenby and Gillies, 2004). Essa técnica, inclusive, permitiu a observação de uma relação de pior prognóstico e maior agressividade tumoral com o aumento da captação de glicose (Mochiki et al., 2004).

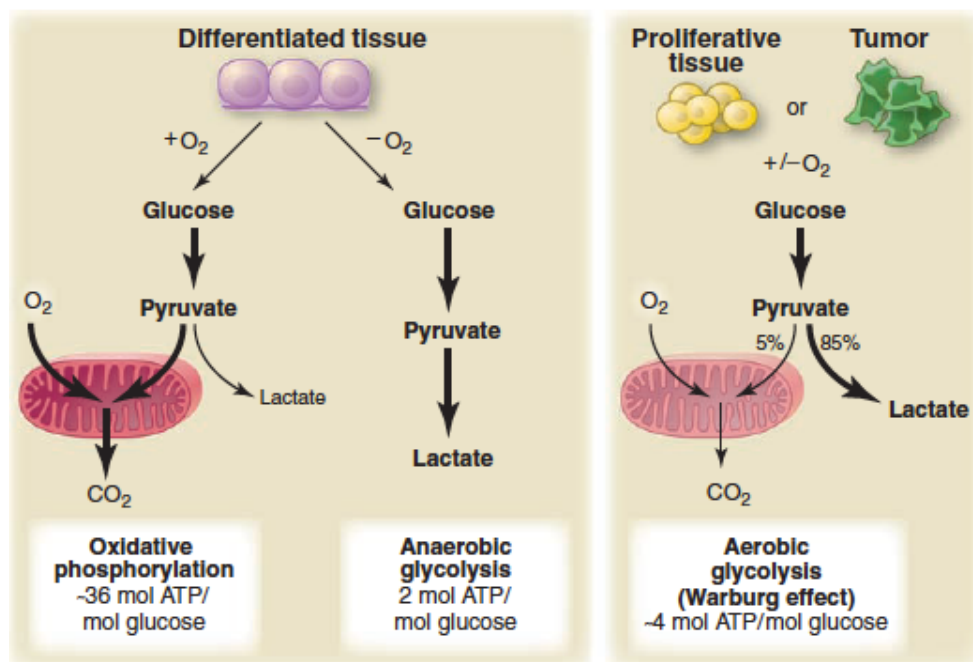


Figura 1. Comparação esquemática do metabolismo de tecidos diferenciados saudáveis e tumores sólidos, demonstrando a diferença da fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica. Evidencia-se também a diferença de eficiência energética desses processos. Adaptado de Vander Heiden et al, 2009.

Após a descoberta de Warburg, novos estudos abordando o metabolismo energético tumoral demonstraram outras rotas metabólicas alteradas, considerando que a glicose é fonte de muitas outras funções celulares além da obtenção de energia, como síntese de nucleotídeos e lipídeos e geração de equivalentes redutores para a defesa antioxidante (como o NADPH) (Herling et al., 2011). Esse conjunto de

alterações no metabolismo energético é intitulado de reprogramação metabólica, característica que foi recentemente classificada como um *Hallmark* do câncer, já que é amplamente encontrada em células tumorais (Hanahan and Weinberg, 2011).

Por muito tempo, este fenômeno não foi compreendido, visto que não se via uma verdadeira vantagem em produzir apenas 4 mol de ATP por mol de glicose pela glicólise aeróbica, mesmo com um aumento na captação de glicose, enquanto que a fosforilação oxidativa gera aproximadamente 36 mol de ATP por mol de glicose. Entretanto, assim como os demais *Hallmarks* do câncer, a reprogramação metabólica apresenta uma base na evolução, de forma que células tumorais adquirem uma vantagem adaptativa ao reprogramar seu metabolismo, desenvolvendo estratégias que permitem com que elas sobrevivam e proliferem em ambientes hipóxicos e com uma alta acidez (baixos valores de pH). Ainda, esse fenômeno gera uma alta variabilidade genética, visto que tanto a hipóxia como a acidez geram instabilidade cromossômica, acelerando assim a taxa de evolução do câncer (Gillies and Gatenby, 2015). Além disso, a reprogramação metabólica permite um aumento na proliferação celular, visto que tumores necessitam do esqueleto de carbono proveniente da glicose e outros intermediários para suprir sua alta taxa biossintética (Gatenby and Gillies, 2004; López-Lázaro, 2010).

O mecanismo pelo qual células tumorais reprogramam seu metabolismo permanece elusivo. Entretanto, sabe-se que as enzimas envolvidas nas rotas metabólicas alteradas apresentam um papel chave na regulação do fluxo dessas vias, e estas podem ser reguladas tanto por moduladores alostéricos, por exemplo, como por alteração em sua expressão gênica. Ainda, sabe-se que uma diferença na expressão de diferentes isoformas de uma mesma enzima podem redirecionar o fluxo de uma via, de acordo com as necessidades metabólicas da célula. Assim, para que o tumor tenha

uma alta taxa de proliferação e para que possa sobreviver a condições ambientais extremas, há uma importante alteração enzimática em seu metabolismo, de forma a expressar preferencialmente isoformas de enzimas que favoreçam sua condição ambiental (Herling et al., 2011). Essas alterações apresentam-se como um possível alvo terapêutico na busca de novos tratamentos que apresentem menor resistência e menores efeitos adversos, bem como um potencial biomarcador tumoral para diagnósticos com prognósticos mais acurados e melhor direcionamento terapêutico.

1.2 Câncer de Pulmão

O câncer é um sério problema de saúde pública da atualidade. Devido ao crescente envelhecimento da população, apesar dos notáveis avanços das pesquisas e do progresso em relação a sua incidência, hoje estima-se que uma em cada três mulheres e um em cada dois homens nos Estados Unidos irão desenvolver a doença durante suas vidas (Siegel et al., 2012). O câncer de pulmão é o tipo mais comum, de forma a apresentar altos números de casos estimados e ser a causa mais frequente de morte por câncer, representando 18,2% das mortes totais. Ainda, 55% dos casos de câncer de pulmão ocorrem em países em desenvolvimento (Ferlay et al., 2010), visto que a diferença de incidência entre países apresenta uma relação direta com a proporção de fumantes entre a população. O tabagismo é a causa de 80% dos casos de câncer de pulmão em homens e de pelo menos 50% dos casos em mulheres (Jemal et al., 2011).

Aproximadamente 85% dos cânceres de pulmão são de não-pequenas células (CPNPC), o qual é subdividido em adenocarcinoma, carcinoma escamoso e carcinoma de células grandes, e a ressecção cirúrgica continua sendo a principal forma de tratamento para os estágios iniciais e doenças localizadas, entretanto a

quimioterapia sistêmica também beneficia esses pacientes (Arriagada et al., 2004). Para doenças avançadas, utiliza-se terapias sistêmicas multimodais, onde apesar de o tratamento ter caráter paliativo, existem evidências de melhoras na sobrevida e qualidade de vida. Atualmente, o padrão-ouro na quimioterapia de pacientes com CPNPC se baseia em agentes alquilantes platinados, cuja eficácia foi demonstrada pela primeira vez em 1988 e posteriormente comprovada por uma meta-análise de todos ensaios clínicos randomizados disponíveis (Ramalingam and Belani, 2008). A resistência a esses fármacos é um grande desafio atualmente, visto que uma grande parcela de pacientes de CPNPC desenvolvem algum tipo de resistência aos medicamentos aos quais são expostos, mesmo que tenham apresentado uma boa resposta inicial. Esse processo pode ser tanto inato como adquirido, e faz com que os pacientes recebam mais de uma linha de terapia durante o tratamento. Os principais mecanismos descritos de resistência à cisplatina são: redução do acúmulo intracelular da droga, aumento da inativação intracelular da droga e aumento da eficiência do reparo ao DNA (Chang, 2011).

1.3 Reprogramação metabólica e CPNPC

A reprogramação metabólica em CPNPC e, mais especificamente, em adenocarcinoma pulmonar, já foi demonstrada em vários estudos. Wu et al caracterizaram duas linhagens de células de CPNPC, sendo uma derivada de um adenocarcinoma, A549, e outra derivada de um carcinoma de células grandes, H460, em relação a seu fenótipo energético. Ambas as linhagens apresentaram um aumento na taxa de glicólise e diminuição da capacidade de fosforilação oxidativa, exibindo um fenótipo Warburg (Wu et al., 2007). Em outro modelo celular, foi demonstrado que p53 está envolvida na reprogramação metabólica, onde células com p53 *wild type*

foram capazes de compensar a necessidade energética por fosforilação oxidativa quando a glicólise foi inibida, o que não aconteceu com células com p53 defeituosa (Sinthupibulyakit et al., 2010). Estudos *in vivo* também puderam comprovar a presença de efeito Warburg em modelos de CPNPC, bem como sua possível relevância clínica como alvo terapêutico (Seth et al., 2011; Shi et al., 2010).

1.4 Biomarcadores

Atualmente, o método utilizado para determinar o prognóstico e o direcionamento terapêutico dos pacientes de CPNPC se baseia no sistema de estadiamento TNM, onde “T” indica o tamanho e a extensão do tumor primário, “N” indica o acometimento de linfonodos e “M” indica a presença de metástase. Apesar de ser o padrão-ouro indicado pela AJCC (American Joint Committee on Cancer) e pela UICC (Union Internationale Contre Cancer) (Mountain, 1997), esse método não considera características biológicas do tumor (Detterbeck et al., 2009). Dessa forma, muitos estudos atualmente focam em identificar marcadores biológicos que possam complementar o sistema TNM para tratamentos mais eficientes

Biomarcadores são substâncias encontradas em fluidos biológicos ou tecidos, cuja detecção ou quantificação podem ser correlacionadas com características e comportamentos específicos da doença. Os marcadores podem ser classificados, de acordo com Sawyers, 2008, como prognóstico, onde podem predizer o curso natural da doença, dando indicação de melhor ou pior desfecho para o paciente; preditivo, o qual auxilia a determinar uma resposta a determinada droga; ou farmacodinâmico, que determina a melhor dose da droga de escolha (Sawyers, 2008).

Existem atualmente na clínica dois biomarcadores utilizados na terapia personalizada, o fator de crescimento epidermal (EGFR) e a cinase de linfoma

anaplásico (ALK). Para pacientes que apresentam a mutação em EGFR, o tratamento de primeira linha são inibidores de tirosina cinase (EGFR-TKI), como gefitinib, erlotinib e afatinib. Já nos pacientes com a mutação em ALK, o tratamento indicado é crizotinib (Thunnissen et al., 2014). Já foi demonstrado que o tratamento com EGFR-TKI atrasou a progressão da doença dos pacientes com a mutação, contudo, não houveram melhoras na sobrevida (Lee et al., 2013). Além disso, apenas uma pequena parcela de pacientes apresenta essa mutação e podem se beneficiar desse tratamento, sendo eles principalmente mulheres asiáticas não-fumantes com adenocarcinoma (Boch et al., 2013). Ainda, muitos pacientes apresentam resistência ao tratamento, onde até mesmo os pacientes mais sensíveis ao tratamento com TKI apresentaram doença progressiva em 10 a 14 meses (Gandara et al., 2014).

A busca por novos marcadores tumorais não é uma tarefa simples, considerando a alta variabilidade entre tumores e as mais diversas características que se encontram alteradas nessas células. Os *Hallmarks* propostos por Hanahan e Weinberg constituem 10 características principais dos tumores, onde cada uma possui diversos mecanismos regulatórios. Entre eles, o metabolismo celular aparece como um importante regulador de diversas características do tumor (Lewis and Abdel-Haleem, 2013) (Figura 2). Estratégias visando a identificação de eventos genéticos e epigenéticos na descoberta de marcadores se mostram promissoras, entretanto, o grande número de alterações que ocorrem em células tumorais dificultam a seleção de um alvo específico para ser estudado. Assim, a busca de biomarcadores necessita, primeiramente, passar por um filtro por onde se possa selecionar moléculas específicas dentro de uma gama de moléculas envolvidas em uma característica ou fenótipo de interesse, de forma que o pesquisador possa, a partir disso, eleger aquelas que se mostram mais promissoras antes de levar seu estudo a diante.

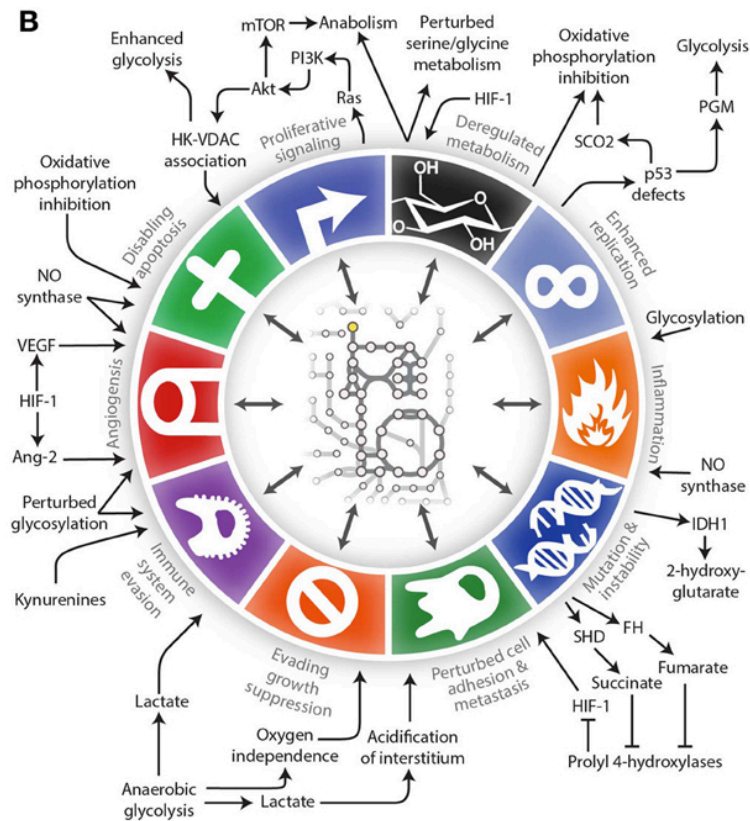


Figura 2. Hallmarks do câncer e suas diversas maneiras de regular ou ser regulado por aspectos metabólicos, evidenciando o papel do metabolismo e a complexidade envolvida na tumorigênese e na reprogramação metabólica. Adaptado de Lewis et. al.

Uma forma de fazer isso é utilizar bancos de dados de microarranjo, por exemplo, disponíveis *online* e analisar os genes de interesse por técnicas de bioinformática, para, só depois de filtrar moléculas promissoras, validá-las em uma coorte clínica e, posteriormente, analisar em modelos celulares o potencial papel terapêutico dessas moléculas (Figura 3). Esse *pipeline* permite uma busca de biomarcadores mais focada e com um melhor custo-benefício, considerando que o filtro inicial por técnicas de bioinformática pode ser feito de maneira gratuita e, só após se obter marcadores promissores é que se passa para a fase experimental.

O melhor entendimento de processos de tumorigênese e de características que são únicas dos tumores contribui para o desenvolvimento e identificação de novos

marcadores moleculares do câncer. O metabolismo energético aberrante é uma característica específica tumoral que se relaciona com os mais diversos processos conhecidos no desenvolvimento de tumores, fazendo-se um alvo de estudo de novos marcadores. Nesse contexto, o estudo do padrão de isoenzimas metabólicas tumoral pode auxiliar na identificação de novos marcadores, de modo a contribuir para a determinação de prognóstico e de novos alvos terapêuticos.

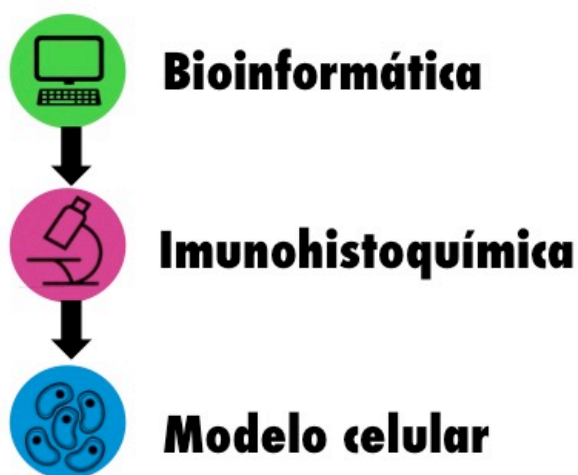


Figura 3. Esquema de um *pipeline* mais eficiente para a busca de biomarcadores, começando por uma abordagem bioinformática e posteriormente passando para modelos mais complexos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar possíveis biomarcadores para adenocarcinoma pulmonar envolvidos com a reprogramação metabólica e validá-los em uma coorte clínica, bem como testá-los em modelo celular, comparando seus papéis na agressividade, tumorigênese e resistência a cisplatina.

2.2 Objetivos específicos

- Prospectar marcadores moleculares envolvidos no metabolismo energético para adenocarcinoma pulmonar através de estudos de bioinformática;
- Avaliar o poder prognóstico dos marcadores encontrados em uma coorte retrospectiva de adenocarcinoma pulmonar;
- Avaliar relação de imunoconteúdo dos marcadores com tumorigênese, agressividade tumoral e resistência a cisplatina em modelo celular;
- Avaliar o potencial terapêutico de inibidores dos marcadores em combinação com cisplatina em modelo celular.

PARTE II

3. ARTIGO CIENTÍFICO – a ser submetido para a revista Oncotarget

Metabolic reprogramming and therapeutic targets in lung adenocarcinoma

Fernanda Stapenhorst França^{1,2}, Marco A. de Bastiani^{1,2}, Carolina B. Muller^{1,2}, Daiani Machado Vargas^{1,2}, Fernanda Martins Lopes^{1,2}, Leonardo Lisboa da Motta^{1,2}, Rosalva T. Meurer³, Marilda C. Fernandes³, Robert Gillies⁴, Fabio Klamt^{1,2,*}

¹ Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 2600 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

² National Institutes of Science and Technology – Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil

³ Laboratory of Pathology Research, UFCSPA, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

⁴ Department of Cancer Imaging & Metabolism, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Tampa, FL 33602, USA

Corresponding Author: Prof. Fábio Klamt, Ph.D., Department of Biochemistry (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 2600 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre (RS) Brazil 90035-003. Phone: +55 51 3308-5556; Fax: +55 51 3308-5535; e-mail: 00025267@ufrgs.br

Keywords: Adenocarcinoma; cancer; metabolism; biomarkers; Warburg

Abstract

Lung cancer is the most common kind of tumor, responsible for most of cancer-related deaths worldwide. Eighty five percent of lung cancer cases are non-small cell lung cancer (NSCLC), where most are classified as adenocarcinoma. Despite progresses made on cancer research, advanced-stage patients' prognosis remains low, hence new therapeutic approaches are necessary. On this work, we focused on tumor metabolic reprogramming, looking for possible tumor biomarkers and therapeutic targets involved on energetic metabolism. Starting with a bioinformatics approach, we selected the genes IDH1, LDHA and PYGB, on which we performed survival analyses from microarray databanks. The protein expression of IDH1 and LDHA were also assessed on a clinical cohort, where we observed an increased expression of IDH1 on tumors when compared to healthy lung tissue. Also, on a cellular model, we observed that both IDH1 and LDHA protein levels were increased on adenocarcinoma cell lines when comparing to healthy lung cells. Combining LDHA inhibitor, oxamate, with cisplatin on A549, we observed a synergic interaction and, on NHBE, we observed an antagonistic effect, showing that this therapeutic approach could be promising. However, when combining IDH1 inhibitor oxalomalate with cisplatin on A549, we observed an antagonistic effect. Hence, this study showed a possible role as lung adenocarcinoma biomarker for IDH1, and a possible therapeutic target role for LDHA.

Introduction

Lung cancer is the most common malignant tumor, representing 12.7% of all new cases, and responsible for 18.2% of total deaths [1]. Approximately 85% of all lung cancers are non-small cell lung cancer (NSCLC) [2] that can be divided according to the histological type in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and large-cell carcinoma. For these patients, treatment is determined by disease stage, and surgery remains the main treatment for early-stage. For advanced-stage patients, chemotherapy with platinum-based agents forms the foundation of their treatment and is critical in determining their survival and quality of life [3]. However, most of the drugs used on chemotherapy is toxic to both tumor and normal cells, and to minimize side effects, they must be administrated in suboptimal levels [4]. This reflects on the poor prognosis for those with advanced stage of disease, where the 5 years survival rate is as low as 3.6% [2]. Chemotherapy resistance is also an important issue, since most of NSCLC patients will develop some kind of resistance to their treatment [5].

Currently, the prognosis and therapy direction is made based on the TNM staging system, which indicates de extension of the tumor, the lymph nodes involvement and whether there are metastasis or not [6]. This system, however, fails to consider the biological features of the tumor, and many studies now focus on discovering biological markers that could complement it and lead to more accurate prognoses and therapeutic modalities. Biomarkers can be prognostic, predictive or pharmacodynamic, and despite the progress that has been made in this area, only a few biomarkers are being used in the clinical practice [7]. For NSCLC patients, there are two biomarkers being used: the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and the Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK). For those

that harbor the EGFR mutation, the first-line treatment is EGFR tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), such as gefitinib, erlotinib and afatinib. For the patients with lung cancer bearing the ALK mutation, crizotinib is the indicated treatment [8]. However, despite of the important progress made with the use of these biomarkers, overall survival did not improve [9]. Moreover, only a few patients carrying this mutation can benefit from this treatment, mainly non-smoker Asian women with adenocarcinoma [10].

An aberrant feature of tumors was discovered in 1926 by Otto Warburg, where he demonstrated an aberrant energetic metabolism on tumor cells, with high glucose consumption and lactate production even in the presence of oxygen, and hence this phenomena is referred to as “aerobic glycolysis”, part of the Warburg Effect [11]. As others alterations in cancer cells metabolism have been discovered, the whole process is known to be a reprogramming of metabolism, where tumor cells go through a metabolic shift, enhancing glycolysis to produce energy and others anabolic pathways to synthesize proteins and lipids independently of oxygen availability [12]. Enzymes that catalyze these reactions present a key role in this process, where alterations on enzyme’s isoforms can redirect the metabolic flux of its pathway, leading to the aberrant metabolism [13]. Considering that the Warburg Effect is a unique feature of tumor cells, the focus on altered metabolic pathways and its regulation rise as a possible target for the search of new biomarkers that could improve the prognosis and the therapeutic direction’s accuracy. Hence, the aim of this study is to prospect lung adenocarcinoma biomarkers related to the energetic metabolism using a bioinformatics approach, and test it on tumor biopsies by immunohistochemistry and also on cell lines,

evaluating a possible relationship with aggressiveness, carcinogenesis and cisplatin resistance, as well as its possible role as a therapeutic target.

Materials and Methods

a. Microarray dataset

The microarray data was extracted from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Five datasets of interest were chosen and analyzed regarding gene enrichment: GEO ID: GSE41271 GSE68465, GSE3141, GSE11117 and GSE42127. For the survival analyses, the three last datasets were also analyzed, as well as GSE11969, GSE12213, GSE31210, GSE37745 and GSE50081 (Table 1).

b. Network setup

The metabolic gene network was created based on energetic metabolism pathways provided by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>), such as glycolysis, pentose phosphate pathway, tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation. We also created a Warburg network, containing classical enzyme isoforms altered on Warburg-like cancer phenotype. The networks were created in R environment using RedeR package [14].

c. Enrichment analysis

In order to evaluate enriched pathways in each group of the datasets, we used a gene set enrichment analysis (GSEA) approach in R environment, using the package RTN.

d. Survival analysis

To analyze whether the isoforms could be associated with survival, we used the

Survival package in R environment to do survival analyses Cox and Kaplan-Meier.

e. Cell culture

The human NSCLC cell lines of adenocarcinoma A549 and EKVX (ATCC) were cultured in RPMI-1640 medium containing 2 mM of L-glutamine, 10% of fetal bovine serum (FBS) and antibiotics, buffered at pH 7.4. Healthy Clonetics™ Normal Human Bronchial/Tracheal Epithelial Cells (NHBE) and Clonetics™ Human Small Airway Epithelial Cells (SAEC) (Lonza) were cultured on Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM™) BulletKit™ with retinoic acid and on Small Airway Growth Media (SAGM™) SingleQuots™ Kit (Lonza), respectively. Cells were maintained in exponential growth in a humidified incubator (5% CO₂, 37°C).

f. Resistance models

For the intrinsic resistance model, A549 cells were treated with 10-fold cisplatin GI₅₀, and cells that survived were considered intrinsically resistant. For the acquired resistance model, cells were treated with gradual doses of cisplatin until 3 μM. After the treatments, the resistance were verified by the increase on the GI₅₀, through SRB technique.

g. Cytotoxicity assay

Cells were seeded in a 96-well plate and, 24 h later, cells were treated with the enzyme inhibitors Oxamate (Sigma- Aldrich) and Oxalomalate (Cayman) or Cisplatin, at different concentrations, or a combination of inhibitor with cisplatin (GI₅₀) for 72 h, and survival was accessed by the sulforhodamine B assay (SRB) as previously described [15]. To evaluate the effect of drug interactions, we determined the Combination Index (CI) of cisplatin treatment with each inhibitor tested. The CI, a measure of synergism and antagonism, is calculated based on the method described

by Chou and Talalay by the computer software CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO, USA). Drugs CI was obtained and ranks as synergism, additive, or antagonism as values of $CI < 0.9$, $CI = 0.9-1.1$, and $CI > 1.1$, respectively [16].

h. Western Blot analysis

Proteins from cell lines were extracted using lysis buffer and hepes-chapes buffer and the protein concentration was accessed by Bradford assay [17]. Proteins (10ug) were separated by acrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore). These blots were stained and de-stained with Ponceau, incubated for 1h at room temperature in TTBS-BSA (3%), washed with TTBS, and incubated overnight with primary antibodies anti-IDH1 (Abcam[®]) and anti-LDHA (Cell Signaling[®]). The blots were labeled with peroxidase-conjugated secondary antibody to rabbit or mouse IgG (Dako) for 2h and visualized by ECL reagents (Millipore). Ponceau stained membranes were used as a control to test for equal protein loading.

i. Immunohistochemistry analysis

Formalin-fixed paraffin-embedded lung AdC tumors from patients diagnosed between 1998 and 2004 were obtained from the Pathology Service at the Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil) [18]. The pathological diagnoses were reviewed and classified by two independent pathologists, according to World Health Organization criteria. Inclusion criteria were lung adenocarcinomas as primary tumor and clinical follow-up data of at least 5 years available. Gender, age, height, weight, histology, pathological stage, smoking history and lung function information were collected. The research program was approved by the local Research Ethics Committee (#1852/08). The Helsinki Declaration of Human Rights

was observed when performing these experiments, and written informed consent was provided.

Sections of 4 μm were deparaffinized and rehydrated, antigen retrieval was performed by pepsin (Zytonvision[®]), endogenous peroxidase was blocked with 5% H₂O₂ in methanol, and nonspecific blocking was done with 1% bovine serum albumin (BSA). The slides were incubated overnight at 4°C with rabbit or mouse monoclonal antibody against IDH1 (Abcam[®]) and LDHA (Cell Signaling[®]) 1:2000 and 1:1000, respectively, in 1% BSA and rinsed and incubated with HRP-labeled polymer-conjugated kit (Invitrogen[®]). Sections were counterstained with hematoxylin. Negative control was obtained performing the same protocol without the primary antibody.

Digital images were obtained at 50x magnification. For image analysis the freeware ImageJ v1.33 as well as the Color Deconvolution plug-in, both downloaded from the NIH website (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) were used. Stained sections were digitized using the same illumination and image capture parameters for each slide. The thresholding operation converted foreground pixels into white color, while background pixels into black color. Thus, the binary image represented the analyzed reaction. The area of positive reaction was estimated by the number of white pixels by evaluating integrated density.

Results

a. Bioinformatic approach

To begin the search of possible NSCLC biomarkers, we used a bioinformatics approach. As a first step to this process, we built a gene network with the genes of the main metabolic pathways that are known to be altered on cancer cells: glycolysis,

pentose phosphate pathway (PPP), tricarboxylic acid cycle (TCA) and oxidative phosphorylation (OXPHOS) (Figure 1a), curated by KEGG website (<http://www.genome.jp/kegg/>). We also built another network containing key enzymes isoforms of those pathways that are described on the literature to be altered on the Warburg phenotype cells, which we called Warburg isoforms (War) (Figure 1b). Also, we highlighted those isoforms on the first network, showing their distribution on the different pathways.

Using microarray data available online, we compared the gene enrichment of those pathways on different patients groups, such as patients that were dead at the end of the study versus patients that were alive, and late-stage disease patients versus early-stage disease patients, as shown in Table 2. For all the dead versus alive comparisons, the Warburg Isoforms group was enriched on patients that had died (Figure 2b), whereas no significant enrichment was found for this group on tumor versus normal tissue or late versus early-stage disease comparisons (Figure 2a and 2c, respectively). The same was found on the pentose phosphate pathway group, and glycolysis was only enriched on two comparisons.

Since the Warburg Isoforms group appear to be one of the most relevant, from this data we could evaluate which genes were contributing the most for the group enrichment. On figure 2d, we can see some classical Warburg isoforms that are deeply studied on the cancer metabolism field, such as LDHA, GLUT3, HK2 and PGK1 almost constantly enriched throughout the analyses made, validating our model. Also, some not so explored genes like IDH1 and PYGB seem to have some importance on the Warburg phenotype and possibly on carcinogenesis and tumor aggressiveness, since they were enriched on tumor versus normal tissue, dead versus alive and late versus early stage disease analyses. Hence, we decided to look further

into these two isoforms, and we also chose LDHA as a classical Warburg isoform to continue our studies.

To investigate the possible prognostic role of these isoforms, we used microarray data from GEO to perform survival analyses, so that we could evaluate whether the genes we chose could be related to the overall survival of patients. We evaluated eight microarray cohorts databases, and to analyze the quality of the cohorts, we performed a cox analysis on the clinical variables. Those cohorts that did not present any significant relationship between disease stage and survival were withdrawn from our study (Table 3). With the two remaining databases, we performed Kaplan-Meier analysis, to see whether the isoforms could be related to survival time. On GSE50081, neither patients on stages from Ia to IIa nor patients on stage IIb presented a significant relationship between isoforms expression and survival (Figure 3a). On GSE37745, on the other hand, there were significant relationships between all the isoforms expression and survival time on early-stage disease patients (Figure 3b), but not on late-stage patients (data not shown).

b. Clinical validation

After using online available microarray data, we analyzed the role of IDH1, LDHA and PYGB on protein level immunohistochemistry analysis on a small cohort from our lab (Table 4). Because of the small number of patients on this cohort, we could not perform Kaplan-Meier analysis, but there was increased protein expression on tumor tissue in comparison to normal adjacent tissue for IDH1, but not for LDHA (Figure 4a). All the cases were negative for PYGB, so we were not able to carry on any analyses for this protein (data not shown). When comparing the protein expression on patients that had died and patients that survived throughout the study, no significant difference was found for IDH1 and LDHA (Figure 4c).

c. Isoforms expression and therapeutic role

We then moved on to a cellular model, in order to look deeper into the isoforms and their expression on different situations. Since we could not evaluate the expression of PYGB on our clinical cohort, we narrowed down our focus to IDH1 and LDHA. On western blot analysis, we compared the expression of these proteins on two different cell lines, A549 and EKVX, where EKVX is a more aggressive tumor cell line (to see the establishment of aggressiveness profile, see table 1 on attached paper), and also on healthy lung primary cells, NHBE and SAEC. There were no significant differences between the two tumor cell lines, but both healthy cells presented a decrease in expression of both IDH1 and LDHA when compared to A549 (Figure 5a).

We also wanted to see whether these isoforms could be related to cisplatin resistance, and we compared their expressions between parental A549 cell line and two models of cisplatin resistance: acquired resistance treated with either 1.5 (AR 1.5) or 3 μ M (AR 3.0) of cisplatin and intrinsic resistance (IR). No significant differences were found between normal A549 and neither of its cisplatin resistance models (Figure 5b).

In order to evaluate the possible therapeutic role of the isoforms, lung adenocarcinoma cell line A549 was treated with LDHA and IDH1 inhibitors oxamate and oxalomalate, respectively, cisplatin, or a combination of one enzyme inhibitor with cisplatin (Figure 6). When combined, oxamate and cisplatin presented a synergic interaction. Interestingly, when combining oxamate with cisplatin on healthy NHBE cells, on the two higher doses there was an antagonism effect. Furthermore, when combining oxalomalate with cisplatin on A549, there was also antagonism effect (Table 5).

Discussion

In the present work, we investigated the possible prognostic and therapeutic role of three enzymes isoforms involved on metabolic reprogramming. Using a bioinformatics approach, we narrowed our study from several genes to three promising targets to further validate on different models. We decided to focus on IDH1, PYGB and LDHA since the role on metabolic reprogramming of the first two are not clearly established on literature, whereas the third one was already deeply studied on the context of the Warburg Effect. As reviewed by Reitman, IDH1 presents an important role in normal cell metabolism on the defense against reactive oxygen species (ROS), providing NADPH, that is also used for peroxisomal fat and cholesterol synthesis. Furthermore, this protein has a crucial role in glucose sensing [19]. On cancer, IDH1 has been extensively studied on gliomas, where mutations on both IDH1 and IDH2 are known to generate oncometabolite 2-hydroxyglutarate (2HG). However, this mutation is present only on gliomas, but not on other solid tumors [20]. Also, IDH1 has been reported as a possible biomarker for NSCLC on tumor biopsies [21] and also as a plasma biomarker [22], although neither of these studies investigated its possible therapeutic role.

In normal cells, PYGB is responsible for cleaving glycogen, releasing glucose 1-phosphate, that can then enter glycolysis or the pentose phosphate pathway. Lew et al. reviewed the importance of altered glycogen metabolism in cancer, where PYGB was shown to have a important role in cancer cell survival [23]. It also appears to have a central importance on resistance to glucose starvation [24]. Furthermore, immunohistochemistry analysis showed that PYGB expression on gastric biopsies could reflect the potential of carcinogenesis of intestinal-type gastric cancer [25].

The gene LDHA encodes the subunit LDH-M of the tetramer of the enzyme lactate dehydrogenase. The isoform LDH-5 is made of four subunits of LDH-M, and this isoform catalyzes the conversion of pyruvate to lactate, the key step of glycolysis [26]. Hence, the gene for LDHA presents a central role on the Warburg effect. Also, it was shown that knockdown of LDHA can inhibit tumor growth on hepatocellular carcinoma [27], as well as on lymphoma and pancreatic cancer xenografts [28].

Using online available databanks, we evaluated the possible role of these isoforms on patients' survival, and results were conflicting. In one of the studies, from GSE37745, all of the isoforms presented significant relationship between expression and survival on early-stage disease patients, whereas on the other, GSE50081, none seemed to be related to survival. This might be due to differences on the cohorts, and on GSE50081 only early stage patients were admitted, and we divided them on stages Ia to IIa and IIb, since cox analysis showed a significant influence of stage IIb on survival.

From there, we decided to evaluate the protein level of the isoforms on a clinical cohort through immunohistochemistry analysis. Although we could not perform a Kaplan-Meier analysis due to the small size of the cohort, we could see that tumors presented an increased immunocontent of IDH1 when compared to healthy samples. The same was not true to LDHA, and neither of the isoforms presented a relationship with tumor aggressiveness, since there were no significant differences of expression between patients that had died and patients that survived. Since PYGB was negative for all cases, we decided not to go further with it, continuing our study only with IDH1 and LDHA.

On a cellular level, we could see the difference on protein immunocontent between tumor cell lines and healthy lung cells, showing that IDH1 and LDHA could

be related to carcinogenesis and metabolic reprogramming. We could not establish a relationship between these proteins and cisplatin resistance or tumor aggressiveness, but this pipeline can easily be used on those models in order to find possible genes involved on those processes.

Furthermore, LDHA therapeutic role was confirmed when combining its inhibitor, oxamate, with cisplatin presented a synergic effect. Also, on healthy lung cells, combination of oxamate with cisplatin presented an antagonism effect, showing that combination of LDHA inhibitor and cisplatin could be a better therapeutic approach, that could present less cytotoxic effects to the normal cells, hence, less side effects. Combining IDH1 inhibitor oxalomalate with cisplatin, however, showed an antagonism effect, hence this isoform does not appear to be a promising therapeutic target. However, more studies are necessary to evaluate if this is only true to this inhibitor, and whether there could be other IDH1 inhibitors that could work along with cisplatin as a better therapeutic approach.

With one approach, we could see two promising targets for lung adenocarcinoma, where one of them, IDH1, presented a important relationship with carcinogenesis and a possible role as a biomarker, whereas LDHA was herein demonstrated as a promising therapeutic target, where its inhibition by oxamate combined with cisplatin presented interesting results that can lead to a promising therapeutic approach. More studies need to be done in order to validate LDHA and IDH1 as possible biomarkers and as therapeutic targets. However, this study presented a background for further studies on these isoforms, and our pipeline allowed us to narrow the focus of several genes to three that seemed more promising, and later narrowing down to two.

Conclusion

LDHA and IDH1 are promising targets for lung adenocarcinoma biomarker and as new therapeutic target, respectively. This study presents valuable data for further development of lung adenocarcinoma biomarkers and new combining therapies that could be more specific and effective than the current therapeutic approach.

References

1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010 Dec 15;127:2893–917.
2. Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al.: Cancer Treatment and Survivorship Statistics , 2012 2012; DOI: 10.3322/caac.21149.
3. Ramalingam S, Belani C: Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions. *Oncologist* 2008 Jan;13 Suppl 1:5–13.
4. López-Lázaro M: A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med* 2010 Mar;16:144–53.
5. Chang A: Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer* 2011;71:3–10.
6. Mountain CF: Revisions in the International for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;171:10–17.
7. Sawyers CL: The cancer biomarker problem. *Nature* 2008;452:548–552.
8. Thunnissen E, van der Oord K, den Bakker M: Prognostic and predictive biomarkers in lung cancer. A review. *Virchows Arch* 2014;464:347–58.
9. Lee CK, Brown C, Gralla RJ, Hirsh V, Thongprasert S, Tsai CM, et al.: Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: A meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:595–605.
10. Boch C, Kollmeier J, Roth A, Stephan-Falkenau S, Misch D, Grüning W, et al.: The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): routine screening data for central Europe from a cohort study. *BMJ Open* 2013;3:1–6.
11. Warburg O: Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science* (80-) 1956;123.
12. Ward PS, Thompson CB: Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate 2013;21:297–308.
13. Herling A, König M, Bulik S, Holzhütter H-G: Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells. *FEBS J* 2011 Jul;278:2436–59.

14. Castro MAA, Wang X, Fletcher MNC, Meyer KB, Markowetz F: RedeR: R/Bioconductor package for representing modular structures, nested networks and multiple levels of hierarchical associations. *Genome Biol* 2012;13:R29.
15. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, Vistica D, Warren JT, et al.: New Colorimetric Cytotoxicity Assay for 1990;1107–1112.
16. Chou TC: Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res* 2010;70:440–446.
17. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
18. Sánchez PG, Vendrame GS, Madke GR, Pilla ES, Camargo JDJP, Andrade CF, et al.: Lobectomy for treating bronchial carcinoma: analysis of comorbidities and their impact on postoperative morbidity and mortality. *J Bras Pneumol* 2006;32:495–504.
19. Reitman ZJ, Yan H: Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: Alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:932–941.
20. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, et al.: IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat* 2009 Jan;30:7–11.
21. Tan F, Jiang Y, Sun N, Chen Z, Lv Y, Shao K, et al.: Identification of isocitrate dehydrogenase 1 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2012 Feb;11:M111.008821.
22. Sun N, Chen Z, Tan F, Zhang B, Yao R, Zhou C, et al.: Isocitrate dehydrogenase 1 is a novel plasma biomarker for the diagnosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2013 Sep 15;19:5136–45.
23. Lew CR, Guin S, Theodorescu D: Targeting glycogen metabolism in bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2015;209:1178–1178.
24. Philips KB, Kurtoglu M, Leung HJ, Liu H, Gao N, Lehrman MA, et al.: Increased sensitivity to glucose starvation correlates with downregulation of glycogen phosphorylase isoform PYGB in tumor cell lines resistant to 2-deoxy-d-glucose. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;73:349–361.
25. Shimada S, Shiomori K, Honmyo U, Maeno M, Yagi Y, Ogawa M: BGP expression in gastric biopsies may predict the development of new lesions after local treatment for early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2002 Jan;5:130–6.
26. Eventoff W, Rossmann MG, Taylor SS, Torff H-J, Meyer H, Keil W, et al.: Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes [Internet]. . *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:2677–2681.
27. Sheng SL, Liu JJ, Dai YH, Sun XG, Xiong XP, Huang G: Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *FEBS J* 2012 Oct;279:3898–910.
28. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, et al.: Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Feb 2;107:2037–42.

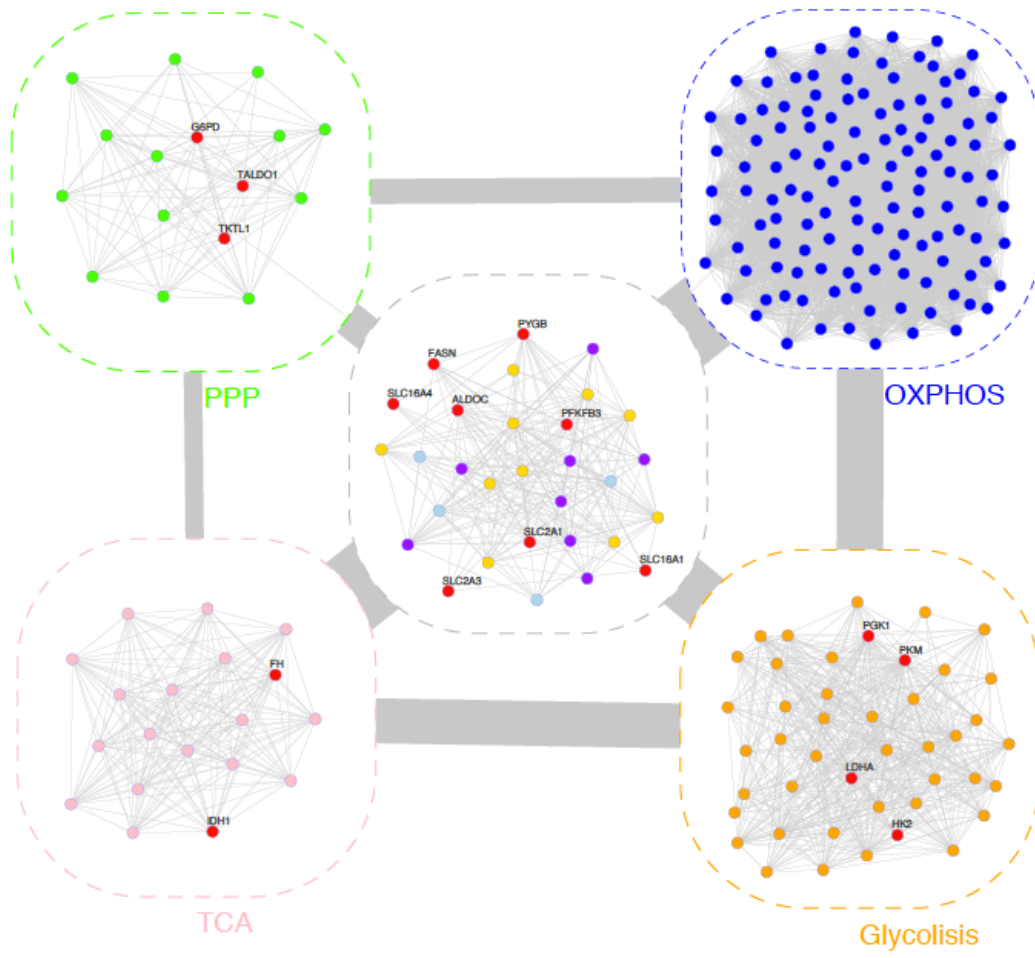
Table 1: Datasets description

GEOID	Title	Sample.description	Sample number	Reference (PMID)
GSE41271	Expression profiling of 275 lung cancer specimens	275 NSCLC specimens, with 183 adenocarcinomas	183	24850841
GSE68465	Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study	442 samples of lung adenocarcinoma	442	18641660
GSE3141	Lung Cancer Dataset	111 samples of NSCLC tissue, with 58 samples of adenocarcinoma	58	16273092
GSE11117	Molecular Classification and Prediction of Survival in Non-Small-Cell Lung Cancer	41 chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer patients and 15 control patients with inflammatory lung diseases	28	19833826
GSE42127	Expression data for non-small-cell lung cancer	176 samples of NSCLC tissue, 133 adenocarcinomas	133	23357979
GSE11969	Expression Profile-Defined Classification of Lung Adenocarcinoma	149 patients with NSCLC including 90 with adenocarcinoma	90	21465578
GSE13213	Relapse-related molecular signature in lung adenocarcinomas identifies patients with dismal prognosis	117 patients with lung adenocarcinomas	117	19414676

GSE31210	Gene expression data for pathological stage I-II lung adenocarcinomas	226 samples of lung adenocarcinoma	226	23028479
GSE37745	Biomarker discovery in non-small cell lung cancer: integrating gene expression profiling, meta-analysis and tissue microarray validation	Fresh frozen tissue of 196 consecutive NSCLC patients, operated between 1995 and 2005; 106 from adenocarcinoma	106	23032747
GSE50081	Validation of a histology-independent prognostic gene signature for early stage, non-small cell lung cancer including stage IA patients	181 Stage I and II NSCLC cases collected at University Health Network (UHN181)	127	24305008

Figure 1.

A)



B)

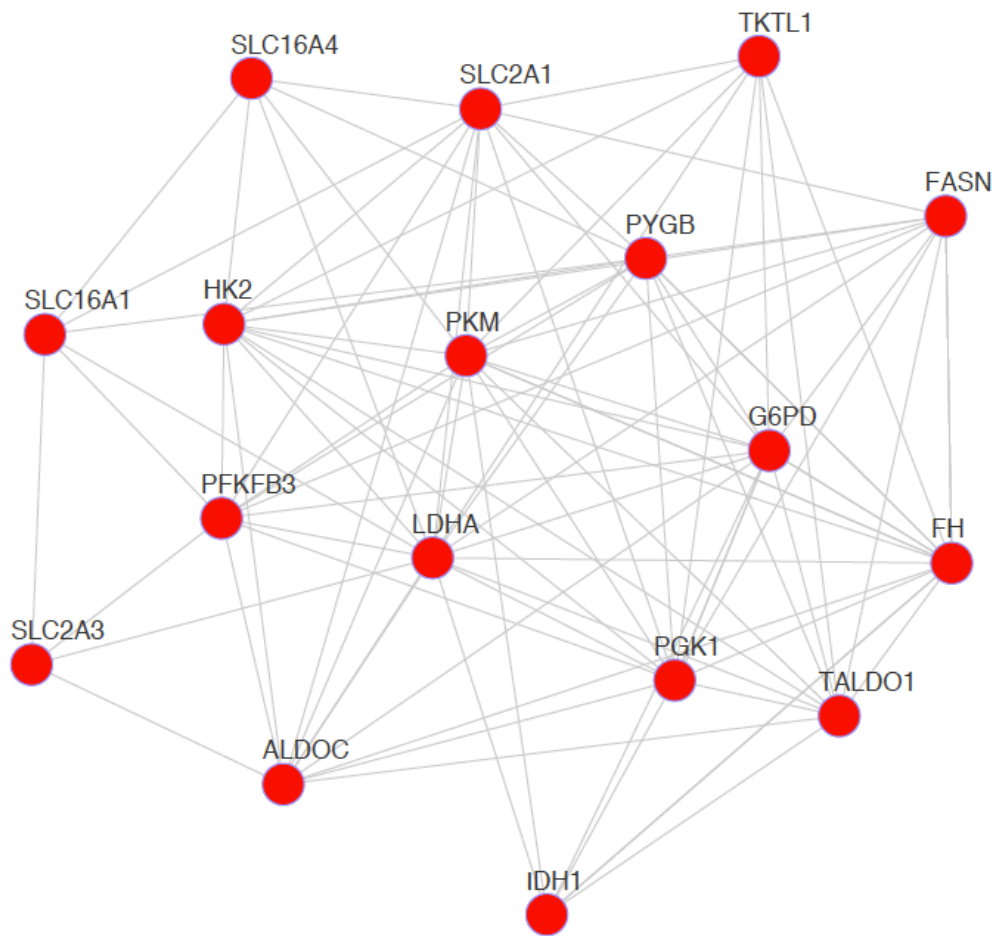


Table 2. GSEA analyses summary

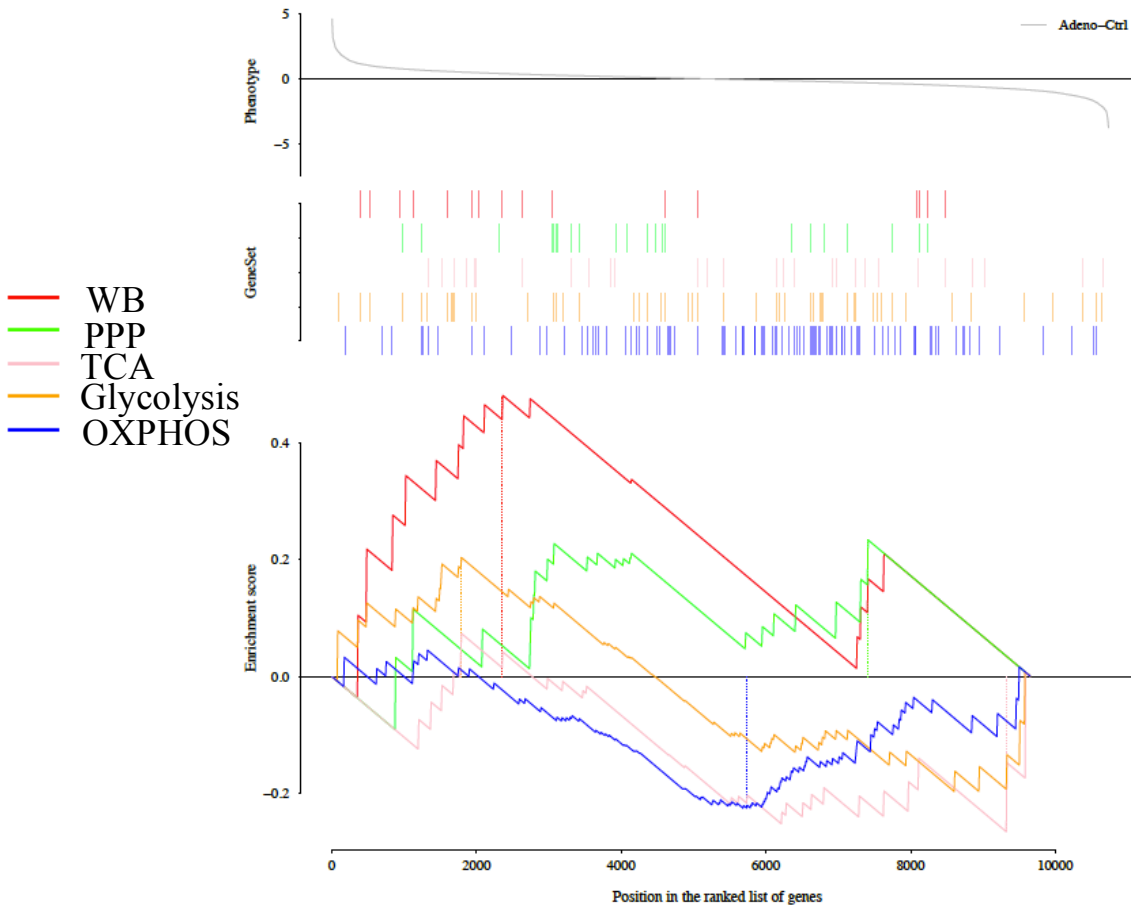
GEOID	Comparisons	n	WB	PPP	TCA	Glycolysis	OXPPOS
GSE11117	Adeno-Control	28	0,25	0,54	0,54	0,54	0,54
GSE3141	Dead-Alive	58	0,0002*	0,003*	0,073	0,0002*	0,073
GSE41271	Dead-Alive	133	0,0002*	0,0079*	0,29	0,09	0,095
GSE42127	Dead-Alive	183	0,031*	0,035*	0,035*	0,069	0,009*
GSE68465	Dead-Alive	442	0,007*	0,05*	0,017*	0,026*	0,0002*
GSE42127	Late-Early	183	0,13	0,11	0,15	0,15	0,086
GSE41271	Late-Early	133	0,079	0,31	0,45	0,079	0,079

Gene set enrichment analyses description and p value for each gene set in every comparison.

*Significant enrichment ($p < 0.05$)

Figure 2.

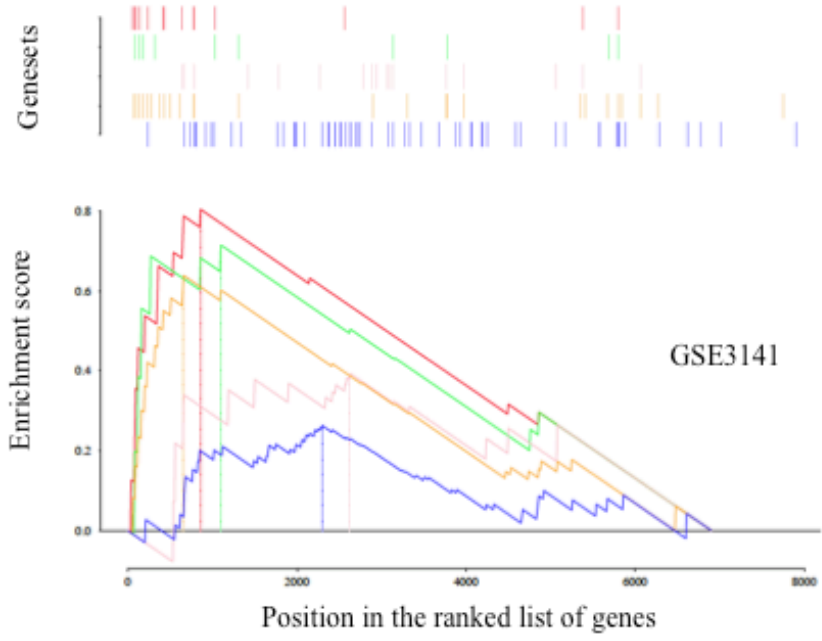
A)

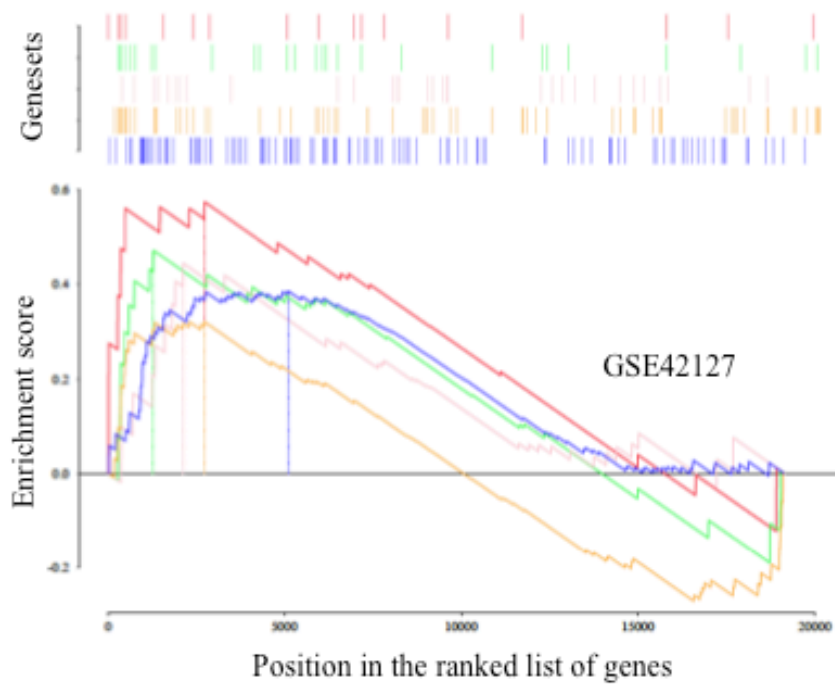
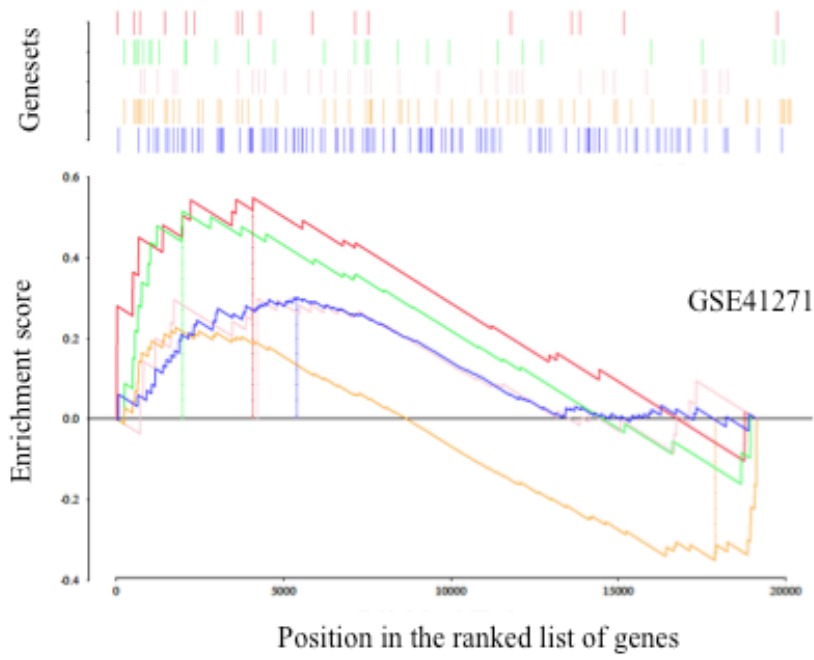


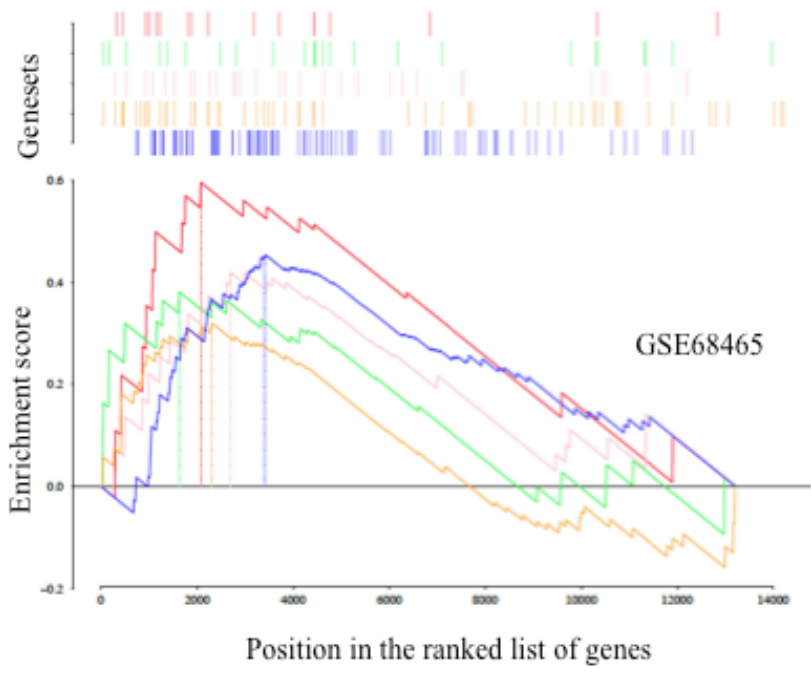
B)



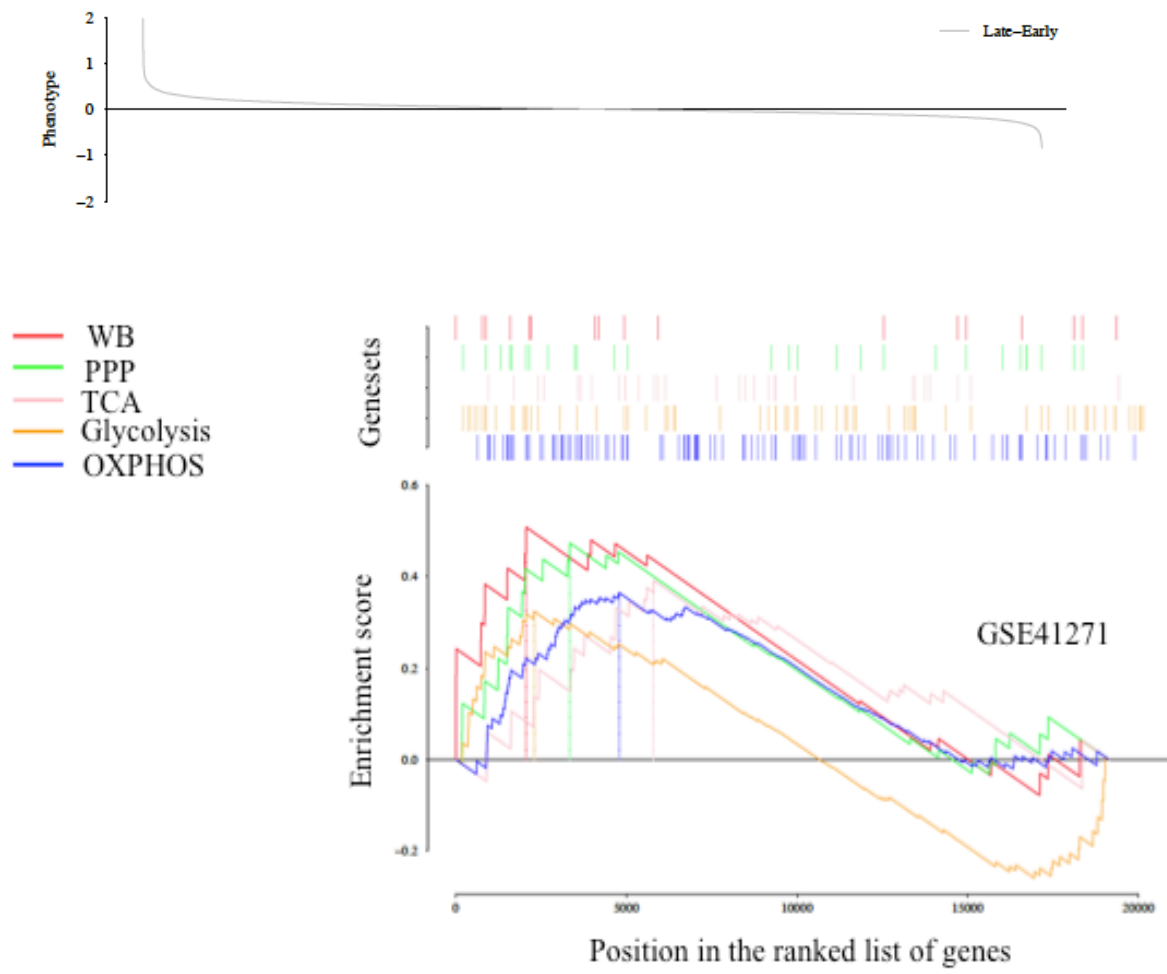
- WB
- PPP
- TCA
- Glycolysis
- OXPHOS

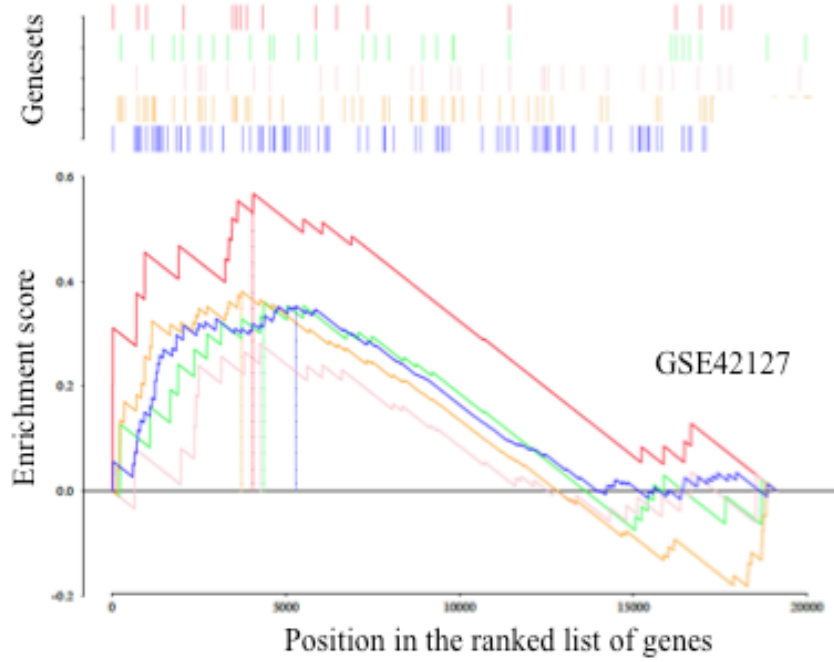






C)





D)

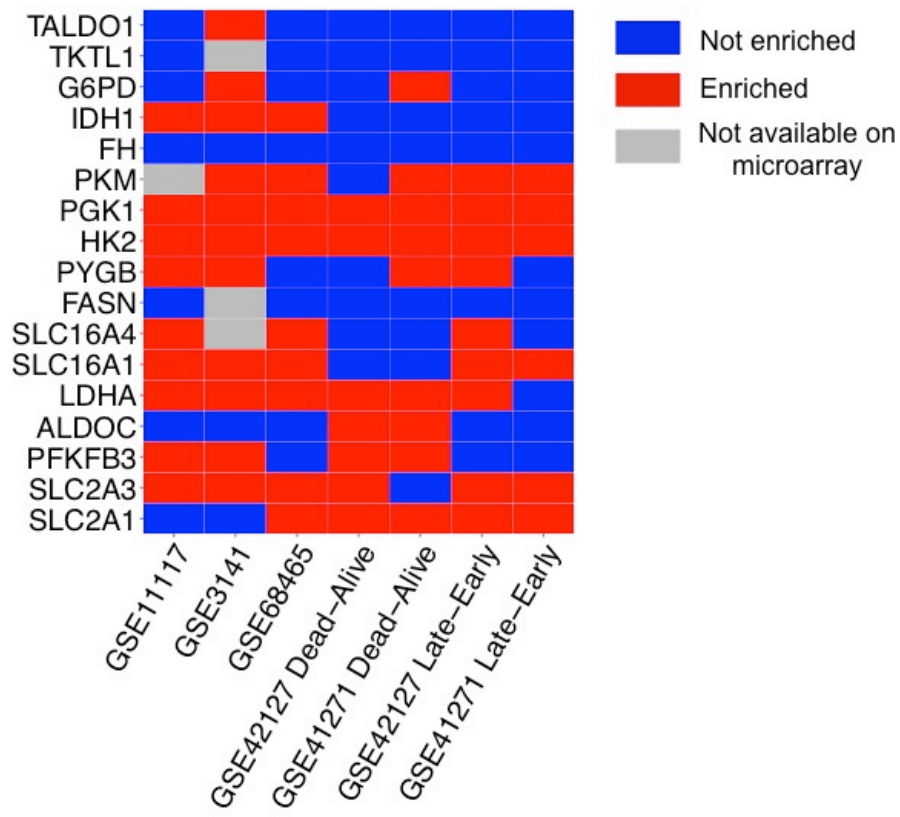


Table 3: Cox analysis for clinical data

GEOID	Characteristics	p value
GSE13213	age	0.280
	Gender (M)	0.034*
	p-Stage late	0.244
	relapse	7.9e-08*
	EGFRWt	0.470
	KrasWt	0.480
	p53Wt	0.272
GSE31210	age	0.19
	Gender (M)	0.42
	p-Stage II	2.8e-05*
GSE11969	age	0.224
	Gender (M)	0.073
	p-Stage late	0.300
	relapseY	1.4e-05*
	EGFRWt	0.412
	KrasWt	0.660
	p53Wt	0.582
GSE50081	age	0.56904
	Gender (M)	0.14492
	p-Stage1 B	0.04598*
	p-Stage 2A	0.15441
	p-Stage 2B	0.00037*
GSE3141	No clinical information	
GSE 37745	age	0.093
	Gender (M)	0.226
	p-Stage late	0.015*
	Performance 1	0.019*
	Performance 2	0.214
	Performance 3	0.595
GSE11117	age	0.37
	Gender (M)	0.11
	p-Stage late	0.20
	Tissue NSCLC-NOS	0.84
	Tissue NSCLC-squa.	0.30
GSE42127	age	0.056
	Gender (M)	0.207
	p-Stage late	0.145

Clinical cox analysis. Studies where disease stage presented significant influence on survival were picked to continue survival analyses. Significant values are considered when *p < 0.05

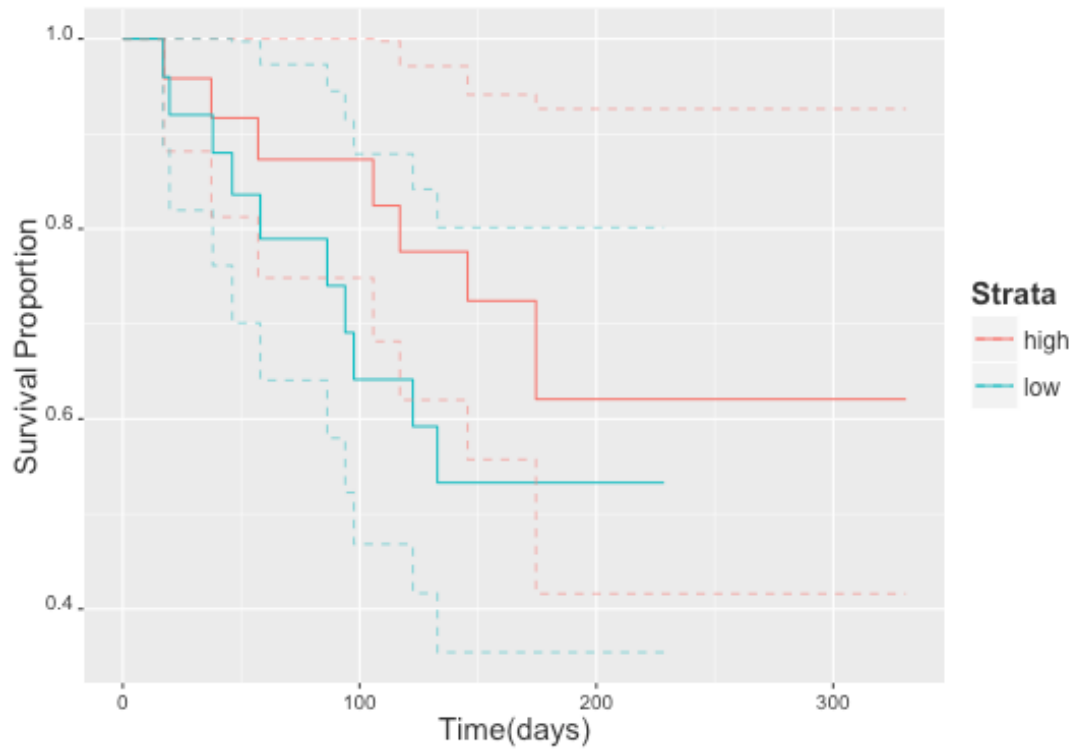
Figure 3.

A)

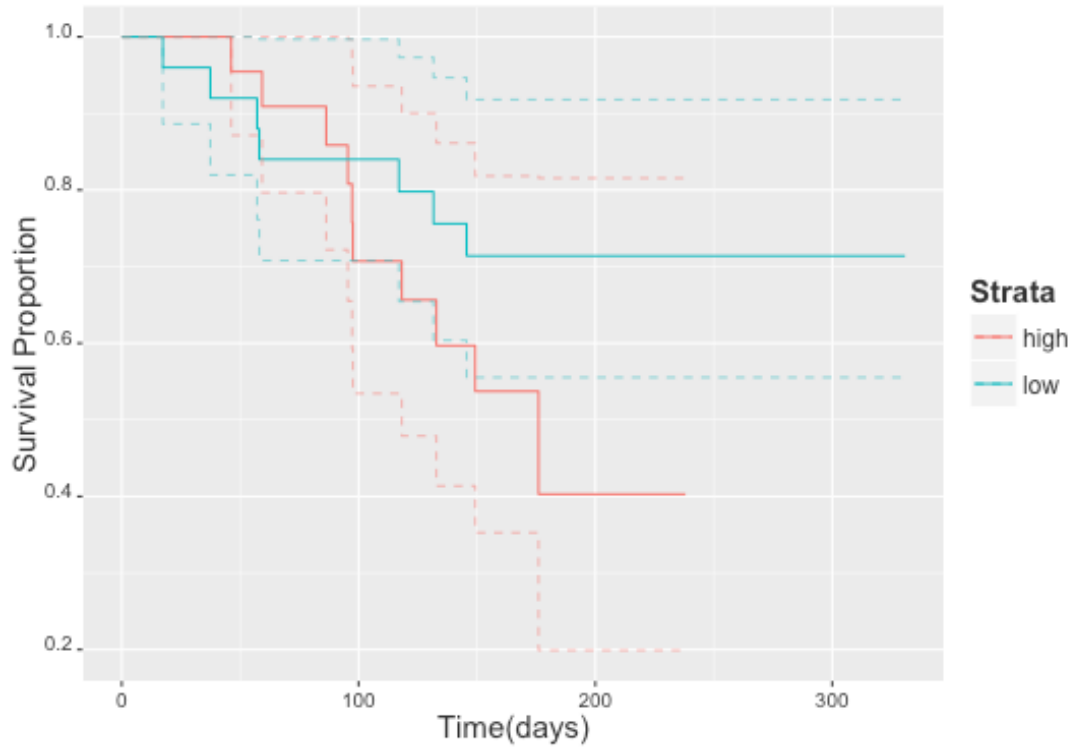
GSE50081

Early stage patients

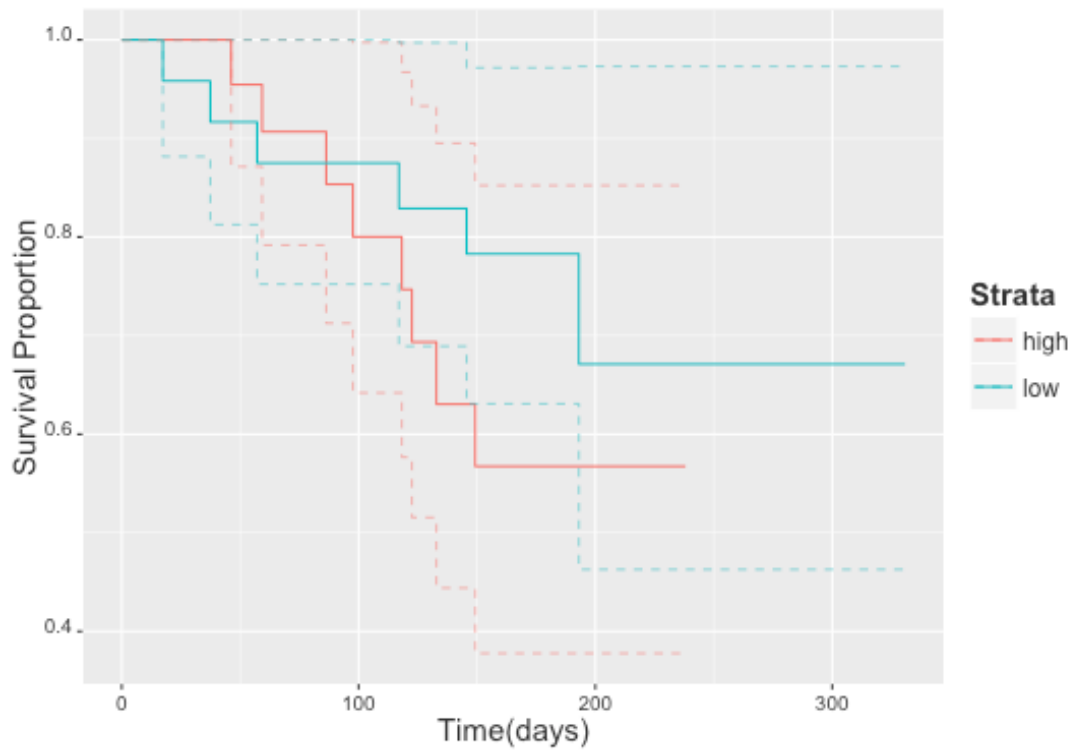
IDH1 (p = 0.63)



LDHA ($p = 0.63$)

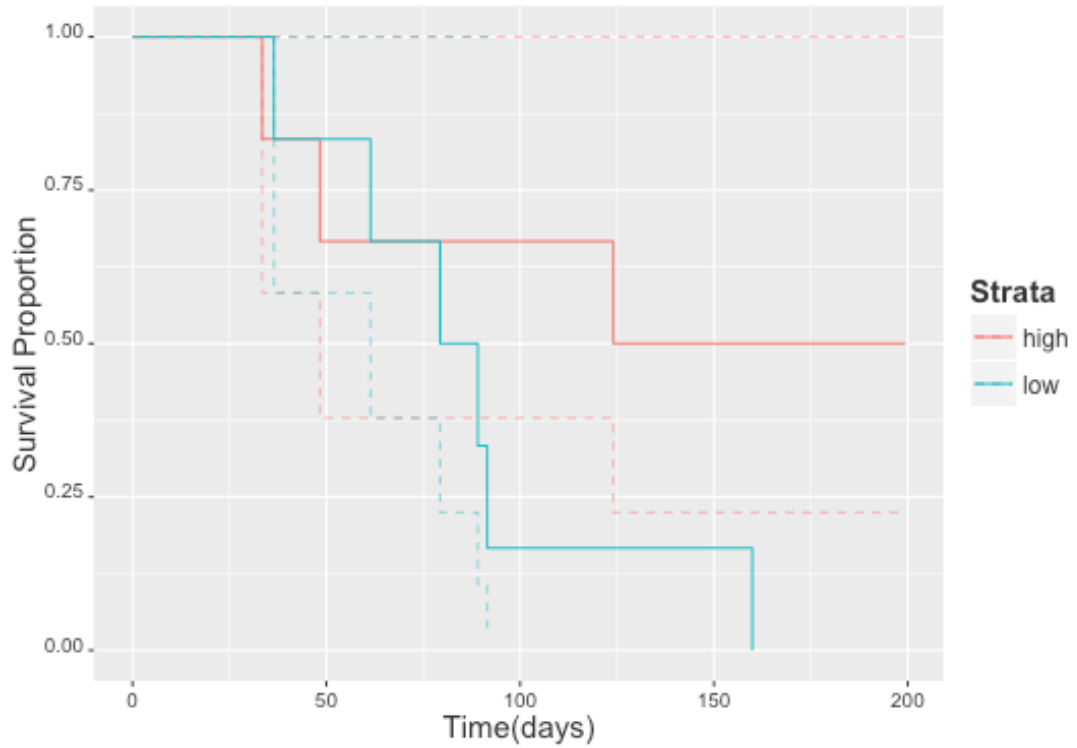


PYGB ($p = 0.606$)

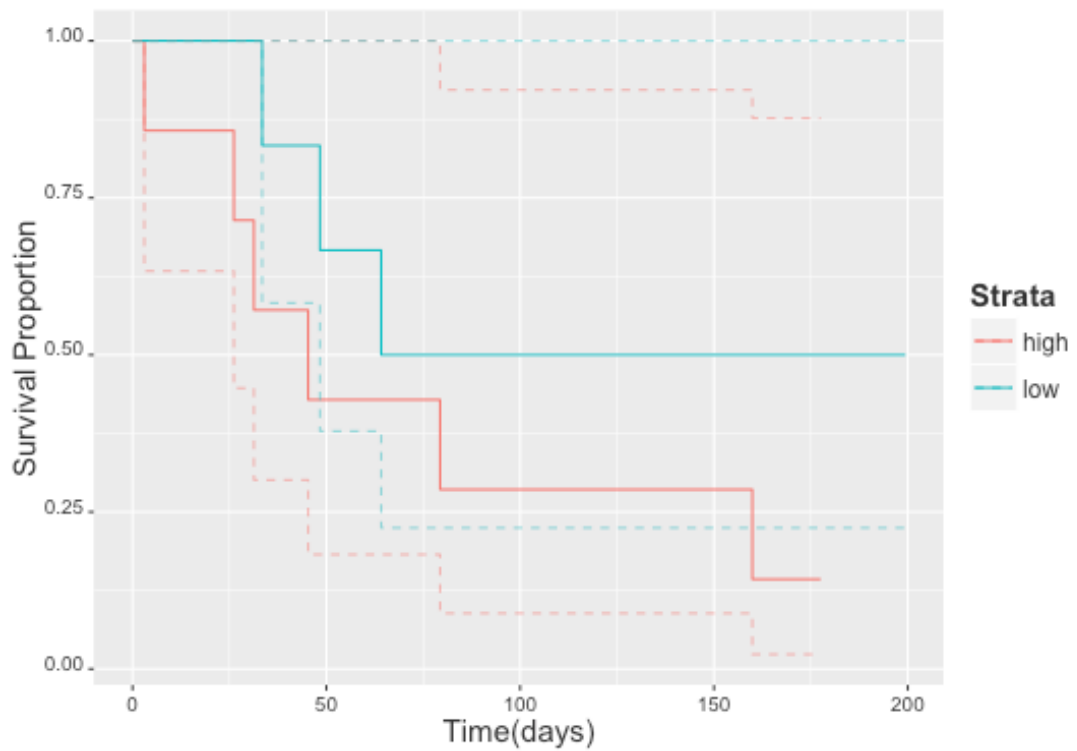


Late stage patients

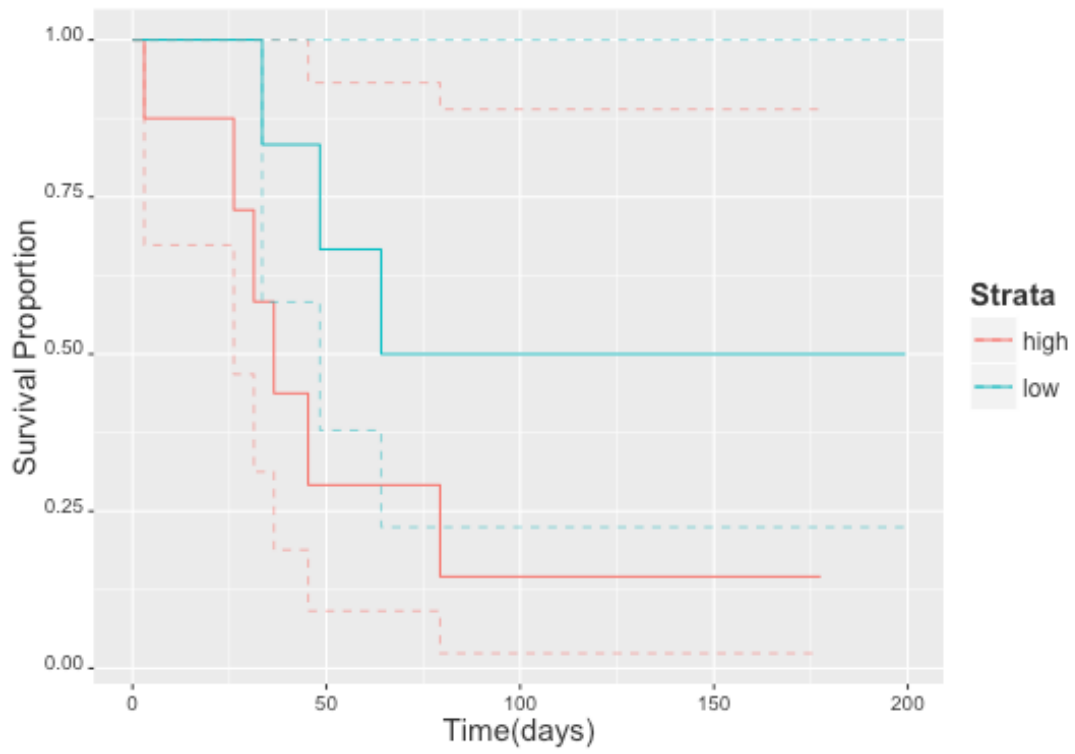
IDH1 (p = 0.213)



LDHA (p = 0.213)



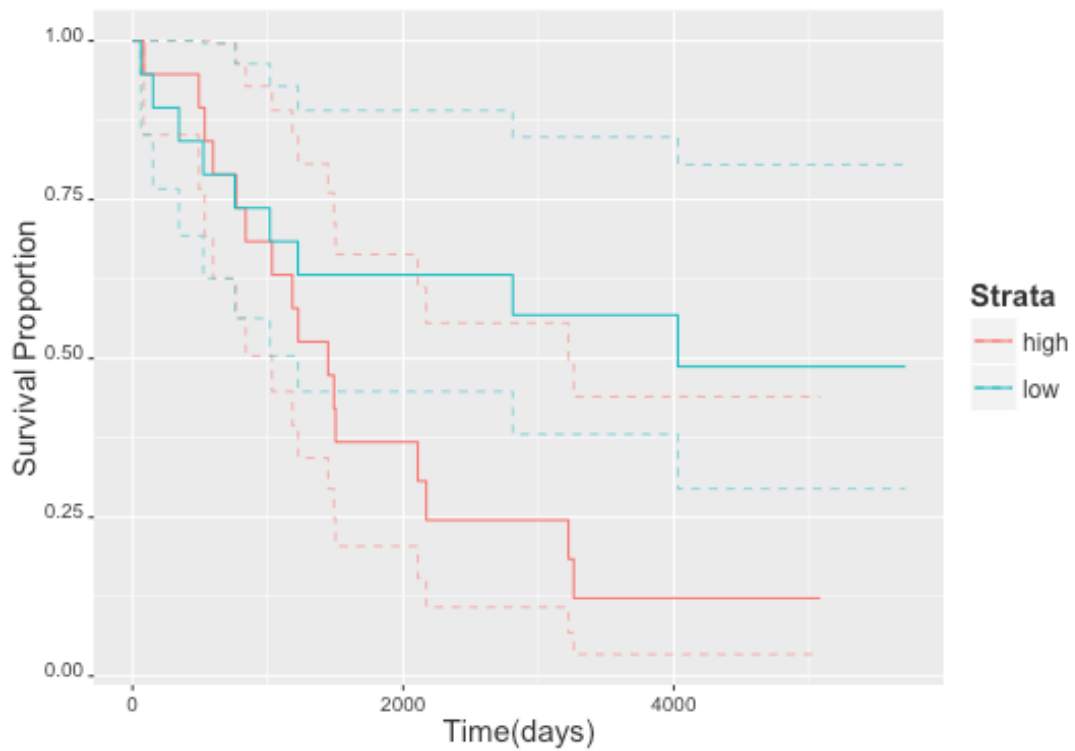
PYGB (p = 0.091)



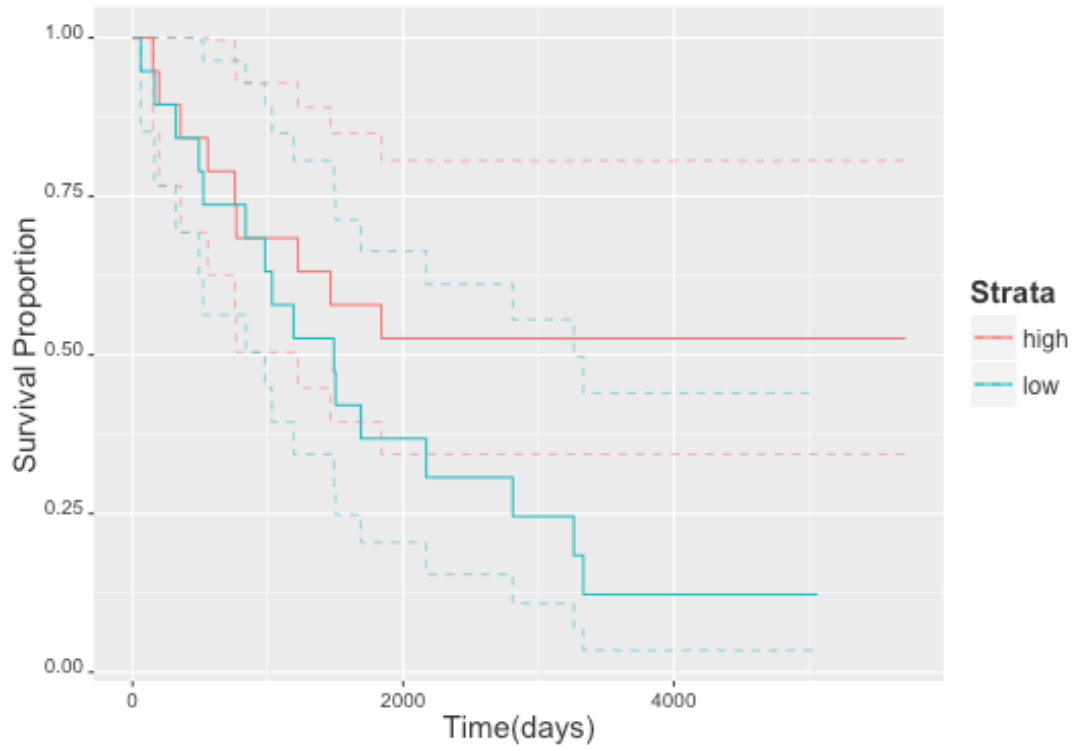
B)

GSE37745

IDH1 (p = 0.0278)



LDHA ($p = 0.0278$)



PYGB ($p = 0.0262$)

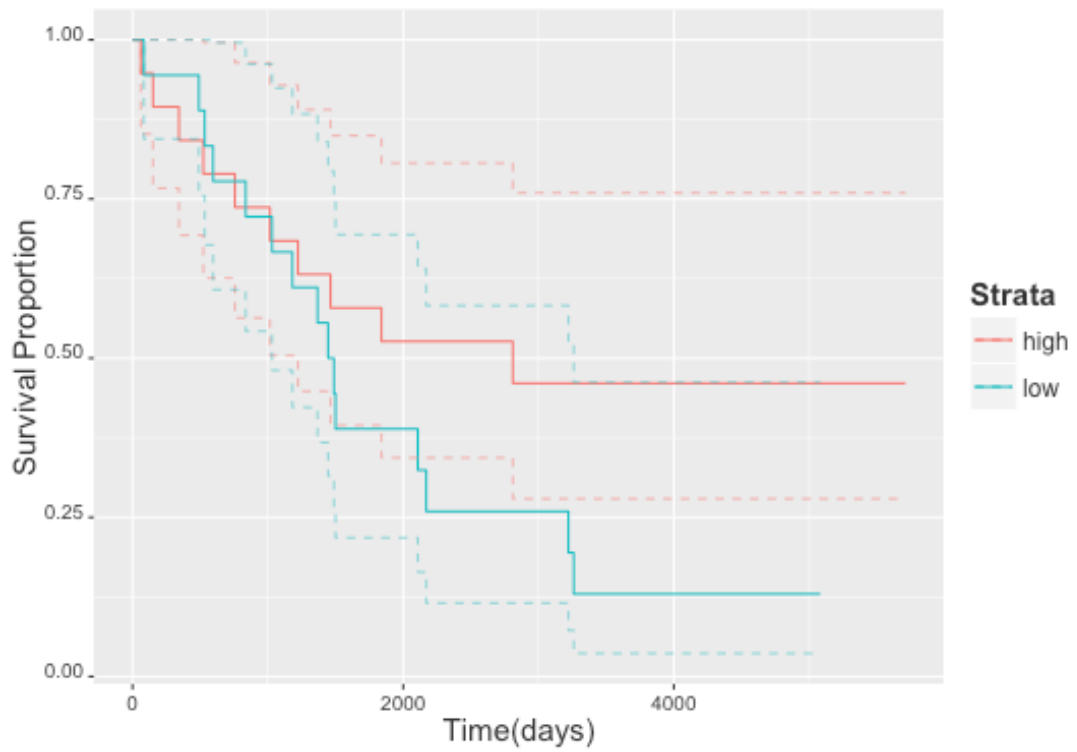


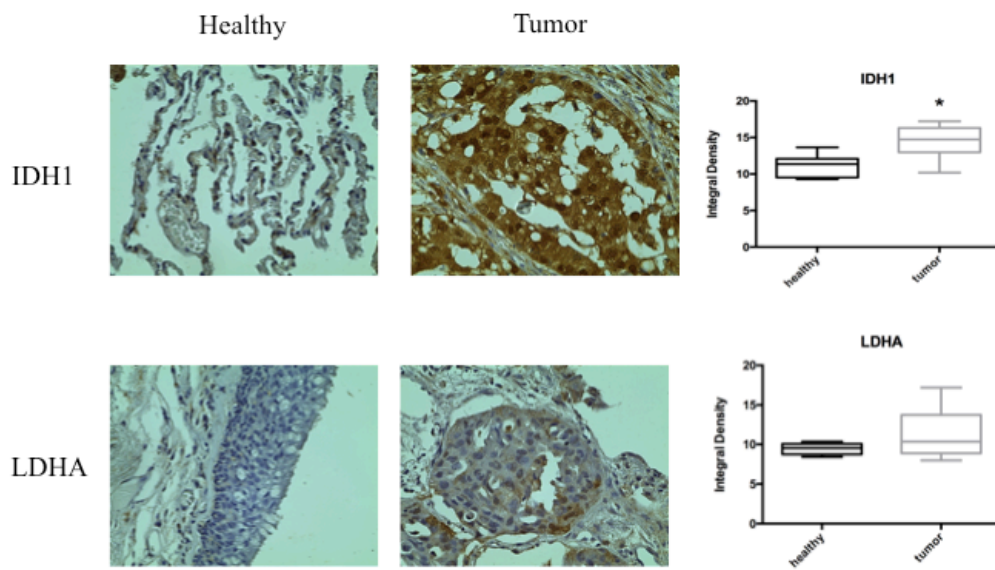
Table 4: Characteristics of lung adenocarcinoma patients

Characteristics	Total n = 36 [100]	P
Age (years)	64 +- 8	0.37 ^a
Males, number [%]	22 [61]	0.50 ^b
Staging, number [%]		0.171 ^b
I A	7 [19]	
I B	16 [44]	
II A	6 [17]	
II B	7 [19]	
Smokers, number [%]	26 [72]	0.26 ^b
FEV1, %	82 +- 22	0.174 ^a
BMI, kg/m ²	25.5 +- 5.5	0.84 ^a

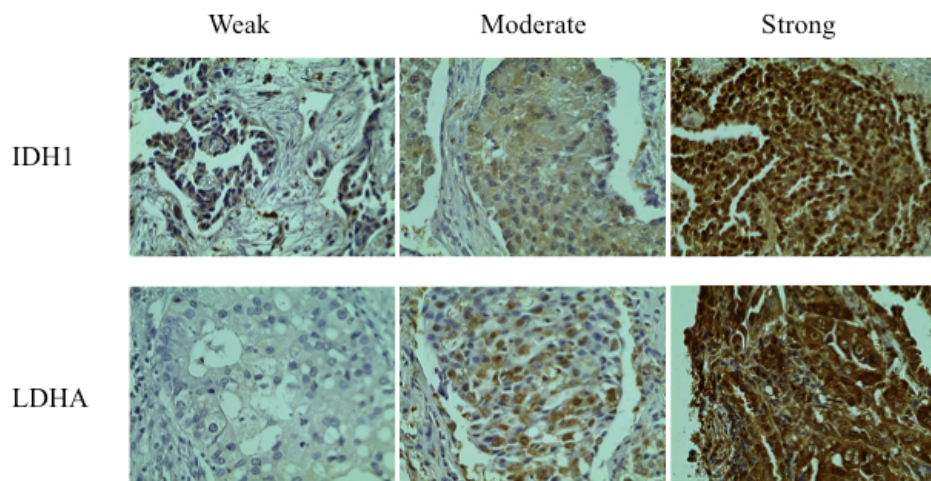
Lung adenocarcinoma cohort characteristics. Data are presented as means +- standard deviation. FEV1%, forced expiratory volume in the first second; BMI, body mass index; P, statistical significance; a, Student's t-test, b, Fisher's exact test

Figure 4.

A)



B)



C)

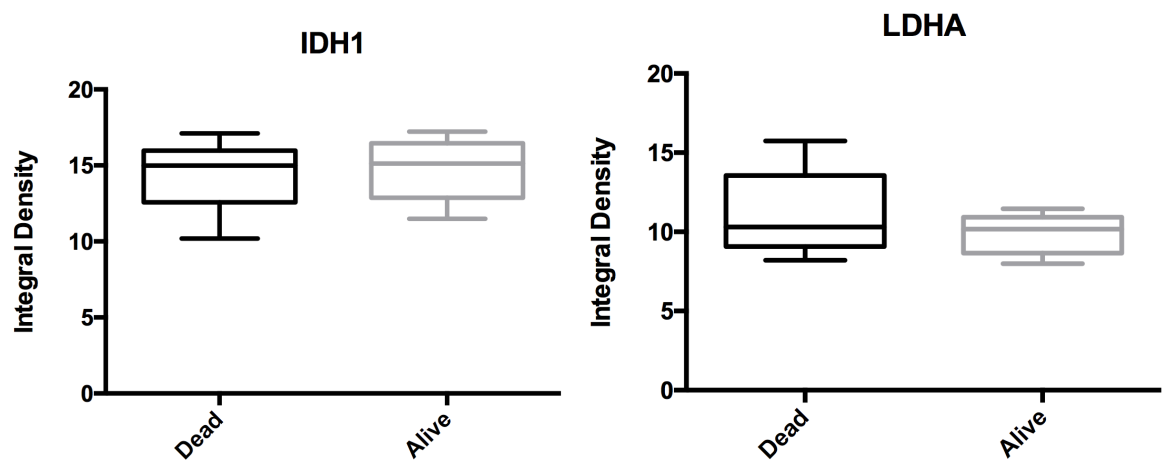
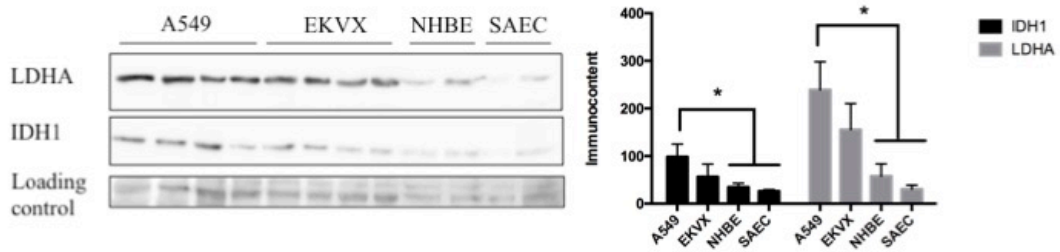


Figure 5.

A)



B)

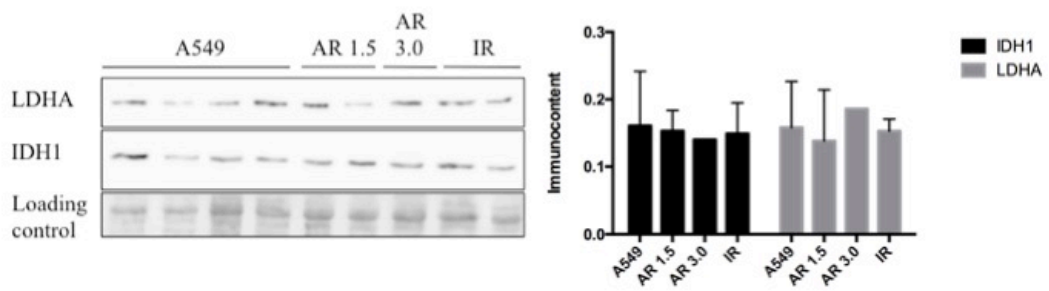


Figure 6.

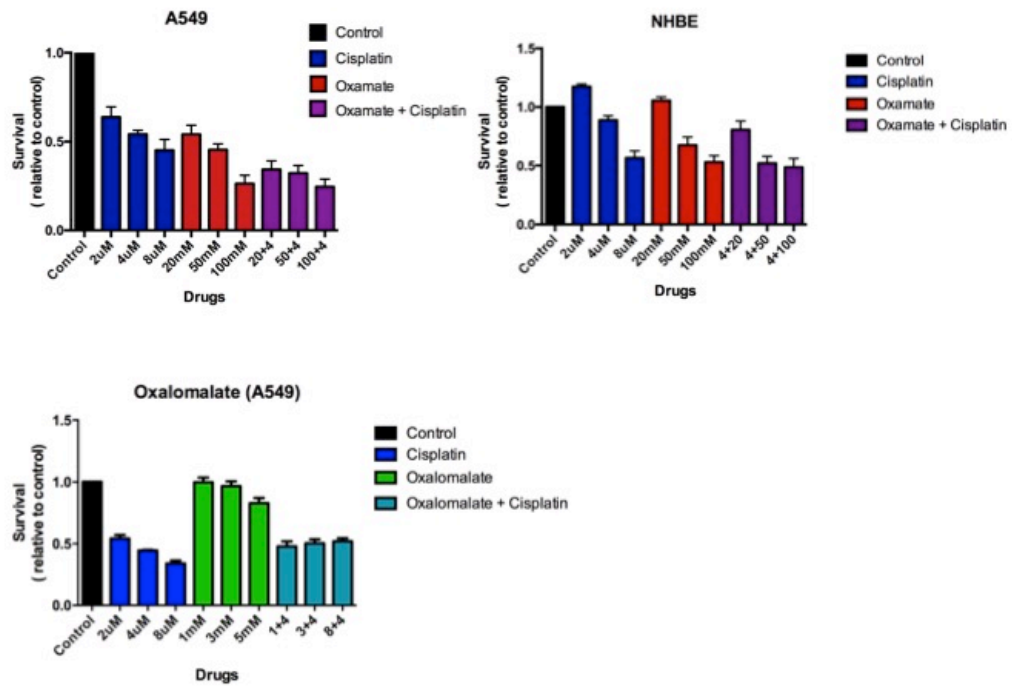


Table 5: Quantitative analysis for assessing enzyme inhibitors drug interaction in combination with cisplatin using dose–response curves.

Drug Combination	Cell Line	Inhibitor dose	CI value	Interpretation
Oxamate + Cisplatin (4 μ M)	A549	20 mM	0.5	Synergism
		50 mM	0.812	Synergism
		100 mM	0.838	Synergism
Oxamate + Cisplatin (4 μ M)	NHBE	20 mM	0.996	Additive
		50 mM	1.174	Antagonism
		100 mM	1.747	Antagonism
Oxalomalate + Cisplatin (4 μ M)	A549	1 mM	1.39	Antagonism
		3 mM	1.847	Antagonism
		5 mM	2.255	Antagonism

Combination index values (CI) of oxamate and oxalomalate treatments with cisplatin. CI values were calculated from cellular proliferation and viability assays (presented in Fig. 6). The data represent means of at least three independent experiments carried out in triplicates (n=3)

Figures legends

Figure 1. Metabolic gene network. A) Gene network from metabolic pathways. Genes were obtained on KEGG. Common genes from multiple pathways are represented in the middle container, where purple are genes shared by TCA and Glycolysis, light blue are shared by TCA and OXPHOS, and yellow are shared by Glycolysis and PPP. Warburg isoforms are the red nodes on multiple containers. B) Warburg isoforms group, containing enzymes isoforms classically altered on Warburg-phenotype tumors, derived from literature.

Figure 2. Gene Set Enrichment Analyses. Plots are presented for Adenocarcinoma tissue versus normal lung tissue (A), dead versus alive patients (B) and late stage versus early stage patients (C). D) Heatmap of specific enriched genes on Warburg isoforms group in each comparison.

Figure 3. Figure 3. Survival analyses. A) Kaplan-Meier analysis on databank GSE50081 for early-stage disease patients and late-stage disease patients. B) Kaplan-Meier analysis on databank GSE37745 for early-stage disease patients. Dashed lines represent confidence interval.

Figure 4. Immunohistochemistry analysis. A) Comparison between healthy lung tissue and tumor tissue staining for IDH1 and LDHA. Tumor tissue presented significantly increased immunocontent for IDH1 ($p < 0.05$), but not for LDHA (Wilcoxon test, $n = 7 - 8$ pairs). B) Comparison between different staining intensity for IDH1 and LDHA. C) Comparison between markers expression on patients that

had died and patients that survived throughout the study. No significant relationship was found (t-test, $n = 6 - 16$).

Figure 5. Western blot analysis of the proteins IDH1 and LDHA. A) Comparison between two adenocarcinoma cell lines and two healthy lung cells. No difference was found between the two tumor cell lines, but healthy lung cells NHBE and SAEC presented a decrease on immunocontent of both proteins when compared to A549 ($p < 0.05$, t-test, $n = 4$). B) Comparison of immunocontent of proteins between different cisplatin resistance models. No significant difference was found (t-test, $n = 4$).

Figure 6. Cytotoxicity analysis of enzyme inhibitors Oxamate and Oxalomalate and combination of inhibitors with cisplatin on A549 and NHBE cells.

Appendix A

Genes included on each gene set

Pentose Phosphate Pathway	TCA cycle	Warburg isoforms
FBP1	CS	SLC2A1
PRPS1L1	DLAT	HK2
ALDOA	DLD	PFKFB3
ALDOB	DLST	ALDOC
RPIA	FH	PGK1
ALDOC	IDH1	PGAM2
G6PD	IDH2	PKM
PGLS	IDH3A	LDHA
GPI	IDH3B	SLC16A3
DERA	IDH3G	FH
PFKL	MDH1	IDH1
PFKM	MDH2	FASN
PFKP	ACLY	G6PD
PGD	ACO1	TKTL1
PGM1	OGDH	TALDO1
PGM2;	ACO2	PYGB
PRPS1	PC	SLC2A3
PRPS2	PCK1	SLC16A4
RPE	PCK2	
RBKS	PDHA1	
TALDO1	PDHA2	
TKT	PDHB	
RPE	OGDHL	
TKTL1	SDHA	
TKTL2	SDHB	
FBP2	SDHC	
RGN	SDHD	
H6PD	PDHX	
	SUCLG2	
	SUCLG1	
	SUCLA2	

Glycolysis

AKR1A1	ALDH1B1	LDHA	PKLR
ADH1A	ALDH1A3	LDHB	PKM
ADH1B	FBP1	LDHC	PGM2
ADH1C	ALDH3B1	PGAM4	ACSS2
ADH4	ALDH3B2	ALDH7A1	G6PC2
ADH5	ALDH9A1	PCK1	BPGM
ADH6	ALDH3A2	PCK2	TPI1
GALM	ALDOA	PDHA1	HKDC1
ADH7	ALDOB	PDHA2	PDHX
LDHAL6A	ALDOC	PDHB	ADPGK
DLAT	G6PC	PFKL	ACSS1
DLD	GAPDH	PFKM	FBP2
ENO1	GAPDHS	PFKP	LDHAL6B
ENO2	GCK	PGAM1	
ENO3	GPI	PGAM2	
ALDH2	HK1	PGK1	
ALDH3A1	HK2	PGK2	
ALDH1B1	HK3	PGM1	

Oxidative phosphorylation					
NDUFC2-KCTD14	COX15	MT-ND4L	NDUFB9	ATP5D	PPA1
COX17	CYC1	MT-ND5	NDUFB10	ATP6V1D	NDUFA12
TCIRG1	ATP6V0E2	MT-ND6	NDUFC1	ATP5E	NDUFA4L2
ATP5H	COX7B2	NDUFA1	NDUFC2	ATP5F1	SDHA
ATP5L	ATP6V0A2	NDUFA2	NDUFS1	ATP5G1	SDHB
UQCR11	ATP6V0D2	NDUFA3	NDUFS2	ATP6V1H	SDHC
COX6B2	ATP6V1C2	NDUFA4	NDUFS3	ATP5G2	SDHD
NDUFA11	PPA2	NDUFA5	NDUFV1	ATP5G3	LHPP
ATP6V1G3	UQCRQ	NDUFA6	NDUFS4	ATP5I	UQCRB
COX4I1	UQCR10	NDUFA7	NDUFS5	ATP5J	UQCRC1
COX5B	COX8C	NDUFA8	NDUFS6	ATP6V1A	UQCRC2
COX6A1	NDUFS7	NDUFA9	NDUFS8	ATP6V1B1	UQCRFS1
COX6A2	MT-ATP6	NDUFA10	NDUFV2	ATP6V1B2	UQCRH
COX6B1	MT-ATP8	NDUFAB1	NDUFV3	ATP6V0C	COX4I2
COX6C	MT-CO1	NDUFB1	ATP12A	ATP6V1C1	ATP6V0E1
COX7A1	MT-CO2	NDUFB2	ATP4A	ATP6V1E1	ATP6V1E2
COX7A2	MT-CO3	NDUFB3	ATP4B	ATP6V0B	ATP6V0D1
COX7B	MT-CYTB	NDUFB4	ATP5A1	ATP6V1G2	COX7A2L
COX7C	MT-ND1	NDUFB5	ATP5B	ATP6V0A1	ATP6V1F
COX8A	MT-ND2	NDUFB6	ATP6V0A4	ATP6AP1	COX5A
COX10	MT-ND3	NDUFB7	ATP5C1	ATP5O	ATP6V1G1
COX11	MT-ND4	NDUFB8	NDUFA13	NDUFB11	ATP5J2

PARTE III

4. DISCUSSÃO

Esse trabalho apresentou duas isoformas de enzimas metabólicas como possíveis alternativas de biomarcadores e na terapia de adenocarcinoma de pulmão. Esse subtipo histológico é o mais comum dentre o câncer de pulmão, sendo altamente letal (Jemal et al., 2011). Assim, a busca de novas estratégias que possam melhorar o tempo ou até mesmo a qualidade de vida desses pacientes se faz de extrema importância, e a abordagem utilizada nesse trabalho permitiu que novos alvos fossem explorados nesse sentido.

Começando por análises de bioinformática, esse trabalho analisou o enriquecimento gênico de quatro vias metabólicas e de um grupo de isoformas enzimáticas alteradas no fenótipo Warburg em vários tipos de comparações: adenocarcinoma *versus* tecido pulmonar sadio; pacientes que morreram durante o tempo de estudo *versus* pacientes que permaneceram vivos e pacientes com doença avançada *versus* pacientes com doença inicial. Nessa análise, pode-se observar que a via da glicólise e a via das pentoses apareceram enriquecidas em pacientes que morreram, corroborando com a ideia de que tumores que apresentam o fenótipo Warburg apresentam uma vantagem evolutiva. De fato, a reprogramação do metabolismo energético tumoral permite um aumento na biossíntese celular, de forma a amparar a alta taxa proliferativa dessas células. Ainda, esse processo auxilia na evasão da apoptose, bem como na sobrevivência de ambientes hipóxicos e a fatores estressantes. (Gillies and Gatenby, 2015; Hsu and Sabatini, 2008). Além disso, na análise de enriquecimento gênico podemos observar que o grupo de isoformas Warburg apresenta-se enriquecido em todas as análises de pacientes que morreram em comparação a pacientes que viveram, ressaltando a importância da alteração de

isoformas de enzimas metabólicas no tumor e na agressividade tumoral.

A partir disso, foi avaliado quais genes especificamente colaboravam mais para esse enriquecimento gênico, e três genes de isoformas enzimáticas foram selecionados para dar continuidade ao estudo. A enzima isocitrato desidrogenase 1 é a isoforma citosólica das IDHs, que tem fisiologicamente funções na síntese de colesterol e de gordura, na defesa antioxidante, ao gerar NADPH, e na sensibilidade a glicose (Reitman and Yan, 2010). A lactato desidrogenase A tem um papel bem elucidado no efeito Warburg, visto que esse gene codifica a subunidade M das LDHs. A LDH-5, composta apenas de subunidades M, é a enzima responsável pela conversão de piruvato a lactato, reação de extrema importância da reprogramação metabólica (Eventoff et al., 1977). Já a glicogênio fosforilase cerebral está envolvida na quebra do glicogênio em glicose 1-fosfato, a qual pode entrar para a glicólise ou via das pentoses (Lew et al., 2015). Essa enzima já foi reportada envolvida na carcinogênese de câncer gástrico (Shimada et al., 2002) e na resistência a privação de glicose (Philips et al., 2014).

Assim, essas três enzimas foram selecionadas e seu papel na sobrevida dos pacientes foi investigado por análises de Kaplan-Meier em dois bancos de dados de microarranjo disponíveis no GEO. Os dois bancos apresentaram resultados contraditórios, onde um apresentou significância na relação de maior expressão e menor sobrevida para as três isoformas, enquanto o outro não apresentou significância para nenhuma. Isso pode ter ocorrido devido a diferenças nas coortes estudadas, não levando a resultados conclusivos.

A expressão de IDH1, LDHA e PYGB foi estudada a nível proteico através de imunohistoquímica em uma coorte clínica do laboratório. Para a enzima PYGB, todos os pacientes foram negativos, não permitindo mais análises. Devido ao pequeno

tamanho da coorte, não foi possível realizar análise de Kaplan-Meier para as enzimas IDH1 e LDHA, mas foi visto que tecidos tumorais apresentavam maior expressão de IDH1 em comparação a tecidos pulmonares saudáveis, demonstrando o papel na carcinogênese de adenocarcinoma pulmonar dessa enzima. O mesmo não foi verdadeiro para LDHA, e nenhuma das duas enzimas apresentaram diferença na expressão entre pacientes que morreram e pacientes que viveram até o fim do acompanhamento do estudo. Esses dados corroboram com um estudo demonstrando o aumento da IDH1 em CPNPC (Tan et al., 2012), demonstrando um possível papel biomarcador dessa enzima.

Passando para modelo celular, esse trabalho encontrou, através de análises de Western Blot, um aumento na expressão da IDH1 e da LDHA em células tumorais de adenocarcinoma pulmonar em comparação com células de pulmão sadio, confirmando o resultado encontrado por imunohistoquímica para IDH1. Ainda, buscamos avaliar um possível papel na resistência a cisplatina dessas enzimas, porém, não houveram diferenças na expressão de IDH1 e de LDHA na linhagem A549 não resistente em comparação com seus modelos de resistência.

Por fim, foi investigado o papel terapêutico das duas isoformas, através do tratamento da linhagem de adenocarcinoma pulmonar A549 com uma combinação do inibidor de uma das isoformas com o tratamento padrão-ouro cisplatina. Foi observado que, ao co-tratar A549 com oxamato, inibidor da LDHA, e cisplatina, houve uma interação de sinergismo, de forma que o oxamato potencializou o efeito citotóxico da quimioterapia padrão. Ainda, quando esse tratamento foi realizado em células pulmonares saudáveis, houve uma interação de antagonismo, onde o oxamato diminuiu a toxicidade da cisplatina, demonstrando que essa combinação pode ser uma importante estratégia terapêutica, de forma a possuir, possivelmente, menos efeitos

adversos. Já no caso do tratamento com o inibidor de IDH1, oxalomalato, em combinação com cisplatina na linhagem A549, houve um antagonismo, demonstrando que o oxalomalato diminui o efeito da cisplatina, não sendo uma boa estratégia terapêutica.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de pulmão é um sério problema da atualidade, sendo um dos tumores mais mortais. Ainda, apesar dos avanços realizados na terapêutica dessa patologia, muitos pacientes apresentam resistência ao tratamento padrão-ouro, a cisplatina. Esse trabalho demonstrou o envolvimento de duas importantes isoformas de enzimas envolvidas em vias metabólicas, IDH1 e LDHA, como possível biomarcador tumoral e como potencial alvo terapêutico, respectivamente.

Através de uma metodologia de busca de biomarcadores, esse trabalho também demonstrou vantagens de se começar esse tipo de pesquisa com uma abordagem bioinformática, a qual permite uma seleção prévia de uma grande gama de moléculas para apenas aquelas que apresentam uma relevância biológica. Isso nos permitiu focar experimentalmente em apenas duas enzimas metabólicas nesse estudo, reduzindo muitos custos e tempo de trabalho.

Muitos estudos ainda devem ser realizados a respeito do possível papel como biomarcador e alvo terapêutico da IDH1 e LDHA, porém esse estudo trás importantes informações iniciais que podem servir para o desenvolvimento de novas terapias para o adenocarcinoma pulmonar, o qual pode gerar menos efeitos colaterais e aumentar a qualidade de vida dos pacientes.

REFERÊNCIAS:

- Arriagada, R., Bergman, B., Dunant, A., Le Chevalier, T., Pignon, J.-P., Vansteenkiste, J.F., 2004. Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 351–360. doi:10.1056/NEJMoa031644
- Boch, C., Kollmeier, J., Roth, A., Stephan-Falkenau, S., Misch, D., Grüning, W., Bauer, T.T., Mairinger, T., 2013. The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): routine screening data for central Europe from a cohort study. *BMJ Open* 3, 1–6. doi:10.1136/bmjopen-2013-002560
- Chang, A., 2011. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer* 71, 3–10. doi:10.1016/j.lungcan.2010.08.022
- Detterbeck, F.C., Boffa, D.J., Tanoue, L.T., 2009. The new lung cancer staging system. *Chest* 136, 260–271. doi:10.1378/chest.08-0978
- Eventoff, W., Rossmann, M.G., Taylor, S.S., Torff, H.-J., Meyer, H., Keil, W., Kiltz, H.-H., 1977. Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 2677–2681.
- Gandara, D.R., Li, T., Lara, P.N., Kelly, K., Riess, J.W., Redman, M.W., Mack, P.C., 2014. Acquired resistance to targeted therapies against oncogene-driven non-small-cell lung cancer: Approach to subtyping progressive disease and clinical implications. *Clin. Lung Cancer* 15, 1–6. doi:10.1016/j.clc.2013.10.001
- Gatenby, R. a, Gillies, R.J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–9. doi:10.1038/nrc1478
- Gillies, R.J., Gatenby, R.A., 2015. Metabolism and Its Sequelae in Cancer Evolution

and Therapy 88–96.

- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Herling, A., König, M., Bulik, S., Holzhütter, H.-G., 2011. Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 278, 2436–59. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08174.x
- Hsu, P.P., Sabatini, D.M., 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703–7. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021
- Jemal, A., Bray, F., Ferlay, J., 2011. Global Cancer Statistics 61, 69–90. doi:10.3322/caac.20107.Available
- Lee, C.K., Brown, C., Gralla, R.J., Hirsh, V., Thongprasert, S., Tsai, C.M., Tan, E.H., Ho, J.C.M., Chu, D.T., Zaatari, A., Osorio Sanchez, J.A., Vu, V. Van, Au, J.S.K., Inoue, A., Lee, S.M., GebSKI, V., Yang, J.C.H., 2013. Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: A meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 595–605. doi:10.1093/jnci/djt072
- Lew, C.R., Guin, S., Theodorescu, D., 2015. Targeting glycogen metabolism in bladder cancer. *Nat. Rev. Urol.* 209, 1178–1178. doi:10.1038/nrurol.2015.111
- Lewis, N.E., Abdel-Haleem, A.M., 2013. The evolution of genome-scale models of cancer metabolism. *Front. Physiol.* 4 SEP, 1–7. doi:10.3389/fphys.2013.00237
- López-Lázaro, M., 2010. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol. Med.* 16, 144–53. doi:10.2119/molmed.2009.00162
- Mochiki, E., Kuwano, H., Katoh, H., Asao, T., Oriuchi, N., Endo, K., 2004. Evaluation of ¹⁸F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography for gastric cancer. *World J. Surg.* 28, 247–53. doi:10.1007/s00268-003-7191-5
- Mountain, C.F., 1997. Revisions in the International for Staging Lung Cancer. *Chest*

1710–17. doi:10.1378/chest.111.6.1710

Philips, K.B., Kurtoglu, M., Leung, H.J., Liu, H., Gao, N., Lehrman, M.A., Murray, T.G., Lampidis, T.J., 2014. Increased sensitivity to glucose starvation correlates with downregulation of glycogen phosphorylase isoform PYGB in tumor cell lines resistant to 2-deoxy-d-glucose. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 73, 349–361. doi:10.1007/s00280-013-2358-8

Racker, E., 1974. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol. Cell. Biochem.* 5, 17–23.

Ramalingam, S., Belani, C., 2008. Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions. *Oncologist* 13 Suppl 1, 5–13. doi:10.1634/theoncologist.13-S1-5

Reitman, Z.J., Yan, H., 2010. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: Alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 932–941. doi:10.1093/jnci/djq187

Sawyers, C.L., 2008. The cancer biomarker problem. *Nature* 452, 548–552. doi:10.1038/nature06913

Seth, P., Grant, A., Tang, J., Vinogradov, E., Wang, X., Lenkinski, R., Sukhatme, V.P., 2011. On-target inhibition of tumor fermentative glycolysis as visualized by hyperpolarized pyruvate. *Neoplasia* 13, 60–71. doi:10.1593/neo.101020

Shi, H.S., Li, D., Zhang, J., Wang, Y.S., Yang, L., Zhang, H.L., Wang, X.H., Mu, B., Wang, W., Ma, Y., Guo, F.C., Wei, Y.Q., 2010. Silencing of pkm2 increases the efficacy of docetaxel in human lung cancer xenografts in mice. *Cancer Sci.* 101, 1447–1453. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01562.x

Shimada, S., Shiomori, K., Honmyo, U., Maeno, M., Yagi, Y., Ogawa, M., 2002. BGP expression in gastric biopsies may predict the development of new lesions

- after local treatment for early gastric cancer. *Gastric Cancer* 5, 130–6.
doi:10.1007/s101200200023
- Sinthupibulyakit, C., Ittarat, W., St. Clair, W., St. Clair, D., 2010. p53 protects lung cancer cells against metabolic stress. *Int. J. Oncol.* 37, 1261–1269.
doi:10.3892/ijo
- Tan, F., Jiang, Y., Sun, N., Chen, Z., Lv, Y., Shao, K., Li, N., Qiu, B., Gao, Y., Li, B., Tan, X., Zhou, F., Wang, Z., Ding, D., Wang, J., Sun, J., Hang, J., Shi, S., Feng, X., He, F., He, J., 2012. Identification of isocitrate dehydrogenase 1 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer by proteomic analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.008821.
doi:10.1074/mcp.M111.008821
- Tennant, D. a, Durán, R. V, Gottlieb, E., 2010. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 10, 267–77. doi:10.1038/nrc2817
- Thunnissen, E., van der Oord, K., den Bakker, M., 2014. Prognostic and predictive biomarkers in lung cancer. A review. *Virchows Arch.* 464, 347–58.
doi:10.1007/s00428-014-1535-4
- Warburg, O., 1956. Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science* (80-). 123.
- Weinhouse, S., 1956. On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science* (80-). 124, 267–268.
- Wu, M., Neilson, A., Swift, A.L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., Chomicz, S., Ferrick, D. a, 2007. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C125–36.

doi:10.1152/ajpcell.00247.2006