

RAFAEL RENATINO CANEVAROLO

**METABOLÔMICA DA RESISTÊNCIA AO  
METOTREXATO NA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

CAMPINAS

2012





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

METABOLÔMICA DA RESISTÊNCIA  
AO METOTREXATO NA  
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA

Rafael Renatino Canevarolo

Dissertação de Mestrado  
apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de  
Campinas – UNICAMP – para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Médicas, área de  
concentração em Ciências  
Biomédicas. Sob orientação do  
Prof. Dr. José Andrés Yunes e co-  
orientação da Dra. Ana Carolina  
de Mattos Zeri.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

C162m Canevarolo, Rafael Renatino, 1985 -  
Metabolômica da resistência ao metotrexato na  
leucemia linfóide aguda. / Rafael Renatino Canevarolo. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : José Andrés Yunes. Coorientador :  
Ana Carolina de Mattos Zeri. Dissertação  
(Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia Linfóide Aguda. 2. Metabolômica. 3.  
Metotrexato. 4. Drogas-Resistência. 5. RMN. I. Yunes,  
José Andrés. II. Zeri, Ana Carolina de Mattos. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Metabolomics of methotrexate resistance in acute lymphoblastic leukemia

**Palavra-chave em inglês:**

Acute Lymphoblastic Leukemia

Metabolomics

Methotrexate

Drug Resistance

NMR

**Área de Concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Mestre em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

José Andrés Yunes [Orientador]

Luiz Gonzaga Tone

Carmen Verissima Ferreira

**Data da defesa:** 25-01-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas



---

## **Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

### **Rafael Renatino Canevarolo**

---

---

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri

---

---

### **Membros:**

---

1. Prof. Dr. José Andrés Yunes -

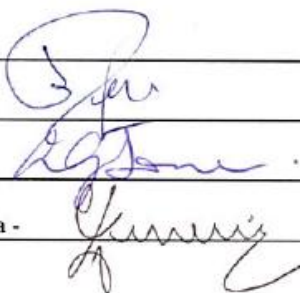
---

2. Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone -

---

3. Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira -

---



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 25/01/2012**

---



## Agradecimentos

*Aos meus queridos pais (e também amigos!), Daniel e Marta, por todo amor e apoio. Sempre.*

*Aos meus avós, familiares e amigos, pelo sorriso quinzenal a me perguntar como as coisas estavam “lá por Campinas”, retribuindo meu relato com palavras de celebração e encorajamento.*

*Aos meus orientadores, Andrés e Ana, por incontáveis momentos de alegria, diálogos e aprendizados.*

*Aos meus companheiros de laboratórios, por tantos bons momentos compartilhados!*

*A vocês, coragem e sucesso!*

*À FAPESP, pelo suporte financeiro; ao Centro Infantil Boldrini e ao Laboratório Nacional de Biociências, LNBio/CNPq, pelo uso de sua infra-estrutura laboratorial.*

*Aos professores avaliadores desta dissertação, pela gentileza de cederem parte de seu tempo à edificação deste trabalho com suas críticas, sugestões e válidas contribuições.*

*E ainda, por uma obrigação de consciência, faço questão de agradecer, nominalmente, a três pessoas:*

*Carolina Souza, querida Carol, minha tutora e amiga, do início ao fim deste projeto. Qualquer gratidão é pouca comparada a tudo que você me ensinou. Muito, mas muito obrigado por compartilhar tudo o que você, com esforço redobrado, teve de aprender sozinha – e pela paciência do tamanho de Minas Gerais que eu lhe obriguei a pôr em prática em todos estes anos!*

*Maurício Sforça, por todas as lições em ressonância magnética nuclear com disponibilidade gratuita e companheirismo. Muito obrigado pelas verdadeiras “aulas” de RMN naquela sala de máquinas empenumbada, barulhenta e gelida!*

*Profa. Márcia Ferreira (IQ-Unicamp), por ter-me aceitado como ouvinte de sua disciplina e sanado minhas intermináveis dúvidas com enorme solicitude, como se eu fosse um de seus orientados.*

*Com um abraço simbólico, agradeço aos que fizeram parte de minha vida nestes quase três anos de “odisséia campineira”!*

*MEU MUITO OBRIGADO A TODOS VOCÊS!*



## El Placer de Servir

*“Toda naturaleza es un anhelo de servicio.  
Sirve la nube, sirve el viento, sirve el surco.  
Donde haya un árbol que plantar, plántalo tú;  
Donde haya un error que enmendar, enmiéndalo tú;  
Donde haya un esfuerzo que todos esquivan, acéptalo tú.  
Sé el que aparta la piedra del camino, el odio entre los  
corazones y las dificultades del problema.*

*Hay una alegría del ser sano y la de ser justo, pero hay,  
sobre todo, la hermosa, la inmensa alegría de servir.  
Que triste sería el mundo si todo estuviera hecho,  
si no hubiera un rosal que plantar, una empresa que emprender.*

*[...] Aquel que critica, éste es el que destruye, tu sé el que sirve.  
El servir no es faena de seres inferiores.  
Dios que da el fruto y la luz, sirve.  
Pudiera llamarse así: "El que Sirve".*

*Y tiene Sus ojos fijos en nuestras manos y nos  
pregunta cada día: ¿Serviste hoy? ¿A quién?  
¿Al árbol, a tu amigo, a tu madre?”*

(Gabriela Mistral, Prêmio Nobel de Literatura de 1945)

*“Que a bondade do Senhor venha sobre nós  
e abençoe a obra de nossas mãos.”*

(Salmo 90:17)



## **RESUMO**

O uso intensivo e combinado de diferentes quimioterápicos tem permitido a cura de 70-80% das leucemias linfóides agudas (LLA) da infância, sendo que a recaída da doença decorre em grande parte da resistência intrínseca das células leucêmicas à quimioterapia. Alguns dos quimioterápicos utilizados na LLA são inibidores metabólicos, como o metotrexato (MTX), antagonista do ácido fólico, que impede a divisão celular ao inibir a síntese de nucleotídeos. Em uma abordagem metabolômica, foi investigada a associação entre linhagens leucêmicas resistentes ou sensíveis ao MTX e metabólitos bioindicadores de cada um destes fenótipos. Seis linhagens celulares B-derivadas e oito T-derivadas foram classificadas como sendo resistentes ou sensíveis ao MTX pelo método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) após 48h de co-cultura com diferentes concentrações da droga. Cinco linhagens foram classificadas como resistentes e nove como sensíveis ao MTX. Após 24h de cultura na presença ou ausência de MTX (ambos em triplicata), os metabólitos intracelulares das linhagens foram acessados por ressonância magnética nuclear (RMN) numa abordagem metabolômica. Ao total, oitenta e quatro metabólitos foram quantificados, dos quais 72 foram também identificados. A análise de componentes principais (PCA) não conseguiu segregar as amostras de acordo com sua resistência, ao passo que a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi efetiva nesta separação. Os metabólitos mais relevantes para a construção dos modelos de classificação quanto à resistência ao MTX, tanto para amostras tratadas quanto controles foram: ATP, dimetilglicina, fosfocolina e sarcosina (associados à resistência); carnitina, CB-09 (composto não identificado), colato, fumarato, glicocolato, lactato, malato e succinato (associados à sensibilidade ao MTX). A capacidade de classificar corretamente as amostras em sensíveis ou resistentes foi obtida com a construção de curvas da característica operativa do receptor (ROC) para os metabólitos individualmente. Os metabólitos com desempenho bom ou excelente na análise ROC ( $AUC > 0,8$ ) foram selecionados para comporem “testes diagnósticos” de classificação de amostras. De todas as combinações possíveis dentre os metabólitos selecionados, o teste que considerou a combinação de carnitina, sarcosina e succinato em amostras não tratadas com MTX apresentou sensibilidade de 100% (identificou todas as 15 amostras resistentes) e especificidade de 92,3% ao classificar corretamente 24 de 26 amostras sensíveis. O melhor teste diagnóstico para amostras tratadas com MTX considerou as concentrações de CB-MTX, glicocolato, sarcosina e succinato; apresentou sensibilidade de 100% (identificou as 15 amostras resistentes) e especificidade de 85,2%, equivocando-se na classificação de 4 dentre 27 amostras sensíveis. As concentrações metabólicas diferenciais apontaram para uma superativação dos metabolismos energético e de lipídeos em linhagens sensíveis ao MTX, ao passo que linhagens resistentes teriam superativado o metabolismo da glicina. As análises metabolômicas e de integração bioquímica dos metabólitos revelaram interações gênicas, enzimáticas e metabólicas que podem estar alteradas em linhagens sensíveis ou resistentes ao MTX, bem como permitiram a especulação sobre possíveis alvos moleculares que poderiam tornar sensíveis células resistentes ao quimioterápico.





## **ABSTRACT**

The intensive use of different and combined chemotherapies has allowed curing 70-80% of pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL), and the relapse of the disease stems largely from the intrinsic resistance of leukemic cells to chemotherapy. Some of the chemotherapies used in ALL are metabolic inhibitors such as methotrexate (MTX), a folic acid antagonist, which prevents cell division by inhibiting the synthesis of nucleotides. The association between leukemic strains resistant or sensitive to MTX and the metabolites associated with each of these phenotypes were investigated. Six B- and eight T-derived cell lines were classified as resistant or sensitive to MTX by the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, after 48h in co-culture with different concentrations of the drug. Five lineages were classified as resistant, and nine as sensitive to MTX. After 24 hours of culture in the presence or absence of MTX (both in triplicates), the intracellular metabolites of the lineages were assessed by nuclear magnetic resonance (NMR), in a metabolomic approach. In total, 84 metabolites were quantified, 72 of which were also identified. The principal component analysis (PCA) did not segregate the samples according to their resistance, whereas the supervised partial least square discriminate analysis (PLS-DA) was effective in this separation. ATP, dimethylglycine, sarcosine and phosphocholine were associated with MTX resistance in both models constructed for treated and untreated samples, whereas carnitine, CB-MTX (unidentified compound), cholate, fumarate, glycocholate, lactate, malate and succinate were associated with sensitivity to MTX. The ability to correctly classify the samples into sensitive or resistant groups was checked with the construction of the receiver operating characteristic (ROC) curves for metabolites individually. Metabolites with good or excellent performance in ROC analysis ( $AUC > 0.8$ ) were selected to compose "diagnostic tests" for classifying samples. Of all the possible combinations among the selected metabolites, the test composed by the combination of carnitine, sarcosine and succinate in untreated samples exhibited sensitivity of 100% (identified all 15 resistant samples) and specificity of 92.3% in classifying correctly 24 of 26 sensitive samples. The best diagnostic test for samples treated with MTX took into consideration concentrations of CB-MTX, glycocholate, sarcosine, succinate. It had a sensitivity of 100% (identified 15 resistant samples) and specificity of 85.2%, classifying incorrectly 4 out of 27 sensitive samples. Differential metabolic concentrations pointed to an over activation of energy and lipids metabolism in MTX-sensitive strains, whereas resistant strains seemed to have overactive the glycine metabolism. Metabolomic and biochemical integration analysis revealed genetic, enzymatic and metabolic interactions that might be altered in strains sensitive or resistant to MTX, as well as allowed speculations about possible molecular targets on which intervention could make resistant cells susceptible to chemotherapy.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 01.</b> Sequência de pulsos “1Dpresat”.....                                                                                                                                                    | 41 |
| <b>Figura 02.</b> Sobrevivência de linhagens de LLA B-derivadas após 48h de tratamento com doses crescentes de MTX.....                                                                                  | 44 |
| <b>Figura 03.</b> Sobrevivência de linhagens de LLA T-derivadas após 48h de tratamento com doses crescentes de MTX.....                                                                                  | 45 |
| <b>Figura 04.</b> Curva esperada dos níveis séricos de MTX em infusão de 6 horas.....                                                                                                                    | 48 |
| <b>Figura 05.</b> Regressão linear a partir dos logaritmos das concentrações de metabólitos intra e extracelulares quantificados em linhagens MOLT-4 e HPB-ALL tratadas com 25nM de MTX por 24h.....     | 49 |
| <b>Figura 06.</b> Exemplo de um espectro de RMN.....                                                                                                                                                     | 51 |
| <b>Figura 07.</b> Componentes principais (PC's) obtidas no software Pirouette para as triplicatas de linhagens sensíveis e resistentes ao MTX, cultivadas na ausência ou presença do quimioterápico..... | 53 |
| <b>Figura 08.</b> Representação bi e tridimensional da análise de PCA para amostras controles e tratadas com MTX pela plataforma MetaboAnalyst.....                                                      | 54 |
| <b>Figura 09.</b> Representação bi e tridimensional da análise de PLS-DA para amostras controles.....                                                                                                    | 56 |
| <b>Figura 10.</b> Representação bi e tridimensional da análise de PLS-DA para amostras tratadas com MTX.....                                                                                             | 57 |
| <b>Figura 11.</b> Relação dos 15 metabólitos com maiores índices VIP, obtidos na construção de modelo PLS-DA para amostras controles ou tratadas com MTX.....                                            | 58 |
| <b>Figura 12.</b> Mapa de calor para os 10 metabólitos mais relevantes na geração do modelo de classificação para amostras controles, segundo a plataforma MetaboAnalyst.....                            | 59 |
| <b>Figura 13.</b> Mapa de calor para os 10 metabólitos mais relevantes na geração do modelo de classificação para amostras tratadas com MTX, segundo a plataforma MetaboAnalyst.....                     | 60 |
| <b>Figura 14.</b> Exemplos de curvas ROC.....                                                                                                                                                            | 63 |
| <b>Figura 15.</b> Concentrações dos metabólitos que compõem os “testes diagnósticos” mais eficientes na detecção da resistência do MTX, em amostras controles ou tratadas com o quimioterápico.....      | 64 |
| <b>Figura 16.</b> Mapa de interação dos metabólitos relacionados à sensibilidade e resistência ao MTX em amostras controles.....                                                                         | 68 |
| <b>Figura 17.</b> Mapa de interação dos metabólitos relacionados à sensibilidade e resistência ao MTX em amostras tratadas com o quimioterápico.....                                                     | 69 |
| <b>Figura 18.</b> Diagrama de conexões entre metabólitos e enzimas relacionadas à sarcosina.                                                                                                             | 78 |



|                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 19.</b> Co-cultura de Nalm 30 com hTERT em dois momentos.....                                                                                                                                                                         | 93  |
| <b>Figura 20.</b> MiniPERM e garrafas de cultura.....                                                                                                                                                                                           | 98  |
| <b>Figura 21.</b> Regressão linear a partir dos logaritmos das concentrações de metabólitos intra e extracelulares quantificados em linhagens REH cultivadas em bioreator MiniPERM ou garrafa de cultura, tratadas com 25nM de MTX por 24h..... | 100 |
| <b>Figura 22.</b> Sobreposição de região espectral de uma amostra submetida à dupla extração e à extração simples.....                                                                                                                          | 101 |
| <b>Figura 23.</b> Sobreposição de região espectral de uma amostra sonicada por 1min30seg e 5min.....                                                                                                                                            | 102 |
| <b>Figura 24.</b> Sequências de pulsos “1D Presat” e “MetNoesy”.....                                                                                                                                                                            | 103 |
| <b>Figura 25.</b> Exemplo de ajuste de <i>locking</i> .....                                                                                                                                                                                     | 109 |
| <b>Figura 26.</b> Ajuste de <i>shimming</i> .....                                                                                                                                                                                               | 109 |
| <b>Figura 27.</b> Determinação da frequência de saturação da água para os experimentos “1Dpresat”.....                                                                                                                                          | 110 |
| <b>Figura 28.</b> Ajuste de fase.....                                                                                                                                                                                                           | 111 |
| <b>Figura 29.</b> Correção da linha de base.....                                                                                                                                                                                                | 111 |
| <b>Figura 30.</b> Deconvolução da referência.....                                                                                                                                                                                               | 112 |
| <b>Figura 31.</b> Deleção da água.....                                                                                                                                                                                                          | 113 |
| <b>Figura 32.</b> O “ <i>Profiling</i> ” – <i>fitando</i> o aminoácido glutamina.....                                                                                                                                                           | 114 |
| <b>Figura 33.</b> Comparação entre variáveis originais e após pré-processamento (autoescalamento) e normalização pela área em amostras tratadas com MTX.....                                                                                    | 117 |
| <b>Figura 34.</b> <i>Screenshot</i> da janela de comando do software Pirouette.....                                                                                                                                                             | 118 |
| <b>Figura 35.</b> Exemplo de uma matriz de confusão (“tabela de contingência”).....                                                                                                                                                             | 120 |
| <b>Figura 36.</b> Exemplos de curvas ROC, com a respectiva qualidade de cada classificador.....                                                                                                                                                 | 122 |



## TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Valores decrescentes de IC <sub>50</sub> e classificação relativa das linhagens quanto à resistência/sensibilidade ao MTX após 48h de tratamento com a droga.....                                                                                      | 46  |
| <b>Tabela 2.</b> Coeficientes de correlação (“r <sup>2</sup> ”) obtidos em regressões lineares entre o conjunto de metabólitos quantificados intra e extracelularmente em uma linhagem sensível (MOLT-4) e uma resistente (HPB-ALL) ao MTX nas condições descritas..... | 49  |
| <b>Tabela 3.</b> Índices obtidos para os modelos de PLS-DA de amostras tratadas e controles.                                                                                                                                                                            | 55  |
| <b>Tabela 04.</b> Área sob a curva (AUC) e classificação do desempenho em análise ROC de metabólitos com maiores índices VIP na construção dos modelos de classificação.....                                                                                            | 62  |
| <b>Tabela 05.</b> Informações genéticas e clínicas das linhagens T- e B- derivadas classificadas como resistentes ao MTX.....                                                                                                                                           | 95  |
| <b>Tabela 06.</b> Informações genéticas e clínicas das linhagens T- e B- derivadas classificadas como sensíveis ao MTX.....                                                                                                                                             | 96  |
| <b>Tabela 07.</b> Concentrações de metabólitos (mmol/L) identificados no meio de cultura de REH após 24h de cultivo em bioreator MiniPERM (M) e em garrafa de cultura celular (G) na presença de 25nM de MTX.....                                                       | 98  |
| <b>Tabela 08.</b> Concentrações de metabólitos (mmol/L) identificados no extrato celular de REH após 24h de cultivo em bioreator MiniPERM (M) e garrafa de cultura celular (G) na presença de 25nM de MTX.....                                                          | 99  |
| <b>Tabela 09.</b> Concentrações observadas e esperadas para glicose e glutamina presentes em duas soluções.....                                                                                                                                                         | 103 |
| <b>Tabela 10.</b> Sensibilidade (S) e especificidade (E) de “agrupamentos” de metabólitos em amostras controles após análises ROC.....                                                                                                                                  | 105 |
| <b>Tabela 11.</b> Sensibilidade (S) e especificidade (E) de “agrupamentos” de metabólitos em amostras tratadas com MTX após análises ROC.....                                                                                                                           | 107 |

## QUADROS

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1.</b> Metabólitos considerados na análise de conteúdo intracelular das linhagens... | 50 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|





## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AKT: serina/treonina proteína quinase.  
AUC: área sob a curva (“*area under the curve*”)  
C-FOS: gene homólogo do oncogene de osteossarcoma viral murino FBJ.  
CK: enzima colina quinase.  
<sup>13</sup>C-RMN: ressonância magnética nuclear de carbono-13  
c-Src: proto-oncogene tirosina-proteína quinase.  
DHFR: dihidrofolato redutase.  
DMGDH: dimetilglicina desidrogenase.  
FPGS: folilpoliglumatato sintase.  
GLUT4: transportadores de glicose do tipo 4.  
GNMT: glicina N-metil-transferase.  
HIF-1: fatores induzidos por hipóxia.  
IC<sub>50</sub>: dose de um fármaco na qual ocorre 50% da inibição máxima observada.  
LLA: leucemia linfóide aguda.  
LLC: leucemia linfóide crônica.  
LMA: leucemia mielóide aguda.  
LV: variável latente.  
MDR: resistência múltipla a drogas.  
MTHFR: metileno-tetrahidrofolato redutase.  
MTX: metotrexato.  
MTXPGs: derivados poliglutâmicos de MTX.  
NF-κβ: fator nuclear kappa-beta.  
PC: componente principal.  
PLS-DA: análise discriminante por mínimos quadrados parciais.  
PCA: análise de componentes principais.  
rCal: coeficiente de correlação de calibração.  
RMN: ressonância magnética nuclear.  
ROC: característica operativa do receptor (“*receiver operating characteristic*”).  
ROS: espécies reativas de oxigênio.  
rVal: coeficiente de correlação de validação.  
SAH: S-Adenosilhomocisteína.  
SAM: S-Adenosilmetionina.  
SARDH: sarcosina desidrogenase.  
SEC: erro padrão de calibração.  
SEV: erro padrão de validação.  
TMO: transplante de medula óssea.  
TNF: fator de necrose tumoral.  
TYMS: timidilato sintase.  
VIP: importância da variável na projeção (“*variable importance in projection*”).



## **SUMÁRIO**

|                                                                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1– INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                            | <b>27</b> |
| 1.1 A LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA.....                                                                                   | 27        |
| 1.2 O METOTREXATO.....                                                                                               | 28        |
| 1.3 BIOLOGIA DE SISTEMAS E METABOLÔMICA.....                                                                         | 29        |
| 1.4 METABOLÔMICA CLÍNICA.....                                                                                        | 31        |
| 1.5 A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....                                                                             | 32        |
| 1.6 ESTUDOS METABOLÔMICOS EM LEUCEMIAS.....                                                                          | 33        |
| <b>2 – OBJETIVOS.....</b>                                                                                            | <b>37</b> |
| <b>3 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                   | <b>38</b> |
| 3.1 MEIO DE CULTURA.....                                                                                             | 38        |
| 3.2 ARMAZENAMENTO E DILUIÇÃO DE MTX.....                                                                             | 38        |
| 3.3 ENSAIOS IN VITRO DE RESISTÊNCIA/SENSIBILIDADE AO MTX PELA<br>REDUÇÃO MTT .....                                   | 38        |
| 3.4 OBTENÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS.....                                                          | 39        |
| 3.5 CULTIVO DAS LINHAGENS COM MTX.....                                                                               | 39        |
| 3.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO CELULAR.....                                                                                 | 39        |
| 3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA LEITURA NO ESPECTRÔMETRO DE<br>RMN.....                                                | 40        |
| 3.8 PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE RMN.....                                                                          | 41        |
| 3.9 ANÁLISES MULTIVARIADAS (PCA E PLS-DA) E CURVAS ROC.....                                                          | 42        |
| <b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                               | <b>43</b> |
| 4.1 OBTENÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA A DOSES CRESCENTES<br>DE METOTREXATO.....                                   | 43        |
| 4.2 DETERMINAÇÃO DO MELHOR TEMPO DE TRATAMENTO, DOSAGEM DE<br>MTX E ESCOLHA ENTRE ANÁLISE INTRA OU EXTRACELULAR..... | 47        |
| 4.3 ESPECTROS E METABÓLITOS.....                                                                                     | 50        |
| 4.4 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA (PCA E PLS-DA).....                                                                        | 52        |
| 4.5 ANÁLISE ROC.....                                                                                                 | 61        |
| 4.6 BIOINDICADORES.....                                                                                              | 65        |
| 4.7 MAPAS DE INTERAÇÃO.....                                                                                          | 67        |
| <b>4.7.1 Metabolismo Energético.....</b>                                                                             | <b>73</b> |
| <b>4.7.2 Ácidos Biliares.....</b>                                                                                    | <b>74</b> |
| <b>4.7.3 Metabolismo de Aminoácidos.....</b>                                                                         | <b>76</b> |
| <b>4.7.4 Metabolismo de Fosfolípides.....</b>                                                                        | <b>80</b> |



|                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.7.5 Algumas Observações.....                                                                                                                                                                      | 81  |
| 5 – CONCLUSÕES.....                                                                                                                                                                                 | 82  |
| 6 – PERSPECTIVAS.....                                                                                                                                                                               | 83  |
| 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                                                                                                 | 84  |
| APÊNDICE 1 – EMPREGO DE MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO E CO-CULTURA COM LINHAGEM DE CÉLULA ESTROMAL DE MEDULA ÓSSEA NA RECUPERAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E ESTABILIDADE DE LINHAGEM LEUCÊMICA LINFÓIDE..... | 92  |
| APÊNDICE 2 – INFORMAÇÕES DETALHADAS DAS LINHAGENS LEUCÊMICAS EMPREGADAS NESTE ESTUDO.....                                                                                                           | 95  |
| APÊNDICE 3 – PADRONIZAÇÕES.....                                                                                                                                                                     | 97  |
| APÊNDICE 4 – TESTES DIAGNÓSTICOS PARA AGRUPAMENTOS DE METABÓLITOS.....                                                                                                                              | 105 |
| APÊNDICE 5 – SEQÜÊNCIA DE PASSOS NO ESPECTRÔMETRO DE RMN E NA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NO SOFTWARE CHENOMX; EXPLANAÇÃO SOBRE ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS E ROC.....                                   | 108 |



## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 A LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA

A leucemia linfóide aguda (LLA) é o câncer mais comum na infância, correspondendo a cerca de um quarto de todos os casos de câncer e a 80% de todas as leucemias que ocorrem até a idade de 15 anos. A ocorrência de diversos tipos de alterações genéticas como translocações, inversões, deleções e duplicações de cromossomos ou partes dos cromossomos, faz com que a LLA seja uma doença bastante heterogênea. Este fato, somado às diferenças inter-individuais dos pacientes, tais como na tolerância e metabolização das drogas, tornaria teoricamente necessário a prescrição individualizada do tratamento. Na prática, porém, os pacientes são classificados em dois grandes grupos - grupo de Alto Risco e grupo de Risco Básico – sendo a intensidade do regime terapêutico adaptada para cada um destes grupos.

Aproximadamente 20% a 30% das crianças que atingem a remissão clínica após a fase inicial de quimioterapia (primeiros 28 dias de tratamento) sofrem recaída da doença. Se a recaída for precoce (até os 36 meses após diagnóstico) as chances de cura são de apenas 10%. Este fato sugere que os critérios atualmente adotados na classificação dos pacientes são insuficientes para avaliar a resposta clínica dos mesmos ao tratamento. De fato, os pacientes que atualmente não são curados poderiam ter melhores chances se fossem identificados ainda no início do tratamento e submetidos a regimes terapêuticos mais específicos e/ou alternativos.

A resistência pré-existente ou adquirida aos quimioterápicos é outro grande problema no tratamento da LLA infantil [1]. Uma variedade de mecanismos celulares pode originar a chamada resistência a múltiplas drogas (MDR), entre eles o aumento na expressão de transportadores celulares, alterações nos mecanismos de desintoxicação, aumento no processo de reparo do DNA, redução na produção dos metabólitos alvos da droga e alterações na regulação do ciclo celular e em vias apoptóticas [2,3].

## 1.2 O METOTREXATO

O metotrexato (MTX), um antifolato, é uma das drogas mais largamente utilizadas no tratamento de LLA infantil. Este antineoplásico apresenta uma ação antimetabólica, inibidora da síntese de DNA, RNA, timidilatos e proteínas [4]. Seu mecanismo de ação é classicamente atribuído à inibição da dihidrofolato redutase (DHFR), a qual catalisa a regeneração de tetrahydrofolatos a partir de dihidrofolatos – produtos tardios da oxidação de reações de transferência de um carbono na síntese de purinas e pirimidinas [5].

O metotrexato é um substrato da folilpoliglumatato sintase (FPGS), que catalisa a adição sequencial de vários resíduos glutamatos ao MTX, formando derivados poliglutâmicos (MTXPGs) que são retidos intracelularmente [6,7]. Devido a esta propriedade [8], os MTXPGs podem se acumular e atingir níveis que excedem substancialmente a capacidade de ligação a DHFR, levando a uma completa inibição da biossíntese dos tetrahydrofolatos a partir dos dihidrofolatos [9]. Além disso, MTXPGs de longa cadeia (i.e., com quatro a seis resíduos de glutamato), inibem enzimas envolvidas na síntese *de novo* de purinas, como a timidilato sintase (TYMS), que catalisa a produção de timidina monofosfato [6,10].

Dentre os fatores relacionados à resistência ao metotrexato estão: reduzida catálise de MTX a MTXPG por FPGS [11,12]; reduzida entrada de MTX na célula devido a deficiências no transporte de membrana [13]; estruturas ou níveis alterados de enzimas alvo (p.ex. DHFR) [14,15] e clivagem hidrolítica aumentada de MTXPG [16]. Além disso, já foi documentado que maiores níveis intracelulares de MTXPG estão associados a melhores prognósticos, tais como em: pacientes pediátricos versus adultos [17]; LLA hiperdiploide versus não-hiperdiploide [18,19] e linhagens B versus linhagens T de LLA [17,19]. Neste último caso, por exemplo, verificou-se que a maior concentração de MTXPG em células de LLA B-derivadas, em relação às T-LLA, se deve à maior expressão do gene FPGS e menor expressão de DHFR [5].



### 1.3 BIOLOGIA DE SISTEMAS E METABOLÔMICA

A chamada “Biologia de Sistemas” (“*Systems Biology*”) é uma recente tendência de abordagem nas investigações biológicas, que busca compreender o “funcionamento” biológico de um organismo vivo ao longo de seus diferentes níveis de organização biomolecular [20]. Trata-se de uma mudança radical: o paradigma da abordagem reducionista tradicional dá lugar a uma visão biológica mais integrativa que procura compreender as conexões entre múltiplas entidades moleculares [21,22].

Para a Biologia de Sistemas, o conceito de “fenótipo” de uma célula não é algo puramente estático, mas emerge como o comportamento coordenado e dinâmico de uma rede de interações entre genes, proteínas e metabólitos; isto implica uma relação próxima entre estrutura de redes de interação e de funcionalidade [23]. Precisamente aí se encontra um dos grandes desafios da Biologia de Sistemas: inferir o máximo de informação biológica, relevante e concreta, a partir dos dados coletados com o auxílio de tecnologias de alta taxa de transferência de informação. As chamadas “plataformas ômicas” – genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e seus subtipos – carregam esta informação das redes das quais são derivadas [24].

O campo emergente da metabolômica, especificamente, combina estratégias para identificação e quantificação de metabólitos celulares usando tecnologias analíticas sofisticadas com a aplicação de métodos estatísticos e de análise multivariada para a extração da informação e para a interpretação dos dados [20]. Enquanto a genômica e a proteômica não revelam tudo o que está se passando no interior de uma célula, a determinação de seu perfil metabólico pode ser como que uma “fotografia” que oferece uma imagem bastante completa do estado fisiológico celular naquele instante [25]. A potencialidade dessa abordagem é tamanha que, com a geração de grandes quantidades de informação metabolômica, acredita-se que várias áreas da biologia, antes inacessíveis ou negligenciadas, venham a ser descobertas ou elucidadas [26].

A metabolômica considera que os metabólitos – moléculas relativamente pequenas, com poucos quilodaltons de massa, intermediários ou produtos finais do metabolismo celular – expressam-se como que em uma “linguagem falada, transmitindo sinais da arquitetura genética e do ambiente” [27]. A metabolômica seria, portanto, uma espécie de “tradutora” que promoveria a “leitura funcional do estado fisiológico” de uma célula ou de

um organismo [27]. As principais áreas de investigação que têm realizado esta “leitura funcional” são:

- Metabolômica vegetal: caracterização de variedades vegetais, controle de qualidade de produtos naturais (vinhos, sucos e extratos) e associação entre perfil metabolômico e valor comercial e/ou resistência a pragas [28-32].
- Metabolômica nutricional: estudos das conseqüências fisiológicas e metabólicas de diferentes dietas em diferentes organismos [33-35].
- Metabolômica da biologia do desenvolvimento: investigação das alterações metabólicas ao longo do desenvolvimento embrionário; associação de alterações de vias bioquímicas e organogênese [36-38].
- Metabolômica clínica: compreensão da etiologia de doenças e fisiologia de condições patológicas e da normalidade; busca por marcadores metabólicos que possam auxiliar a tomada de decisões nos mais variados estágios clínicos [39-46].
- Farmacometabolômica: investigação das alterações metabólicas de parasitas ao longo de seu ciclo de vida visando à descoberta de novos alvos terapêuticos; compreensão das alterações metabólicas proporcionadas por diferentes drogas em diferentes indivíduos; controle de qualidade de fármacos [47-52].

Com relação às técnicas utilizadas em estudos metabolômicos, estas podem ser classificadas em:

- Técnicas de separação: eletroforese capilar (CE), cromatografia gasosa (CG) e cromatografias líquidas de alta e ultra performance (HPLC e UPLC, respectivamente).
- Técnicas de detecção: espectrometria de massas (MS) e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN).
- Técnicas mistas: cromatografias gasosa ou líquida de ultra desempenho acopladas à espectrometria de massas (CG-MS e ULPC-MS).

Cada técnica apresenta suas próprias particularidades, de modo que suas vantagens e limitações devem ser levadas em consideração em cada estudo metabolômico [21,25,45].

## 1.4 METABOLÔMICA CLÍNICA

Nos últimos anos, a metabolômica clínica tem observado um rápido crescimento no número de estudos direcionados a encontrar biomarcadores – metabólitos característicos de casos clínicos particulares – que visam auxiliar diagnósticos, prover diretrizes terapêuticas e avaliar a resposta à terapia de doenças específicas [22,52,53].

De fato, não são poucas as especialidades médicas que começaram a reavaliar várias patologias ou condições clínicas a partir de uma perspectiva metabolômica. Dentre estas áreas estão: cardiologia [54,55], infectologia [56,57], gastroenterologia [43,58], oftalmologia [59], endocrinologia [60], oncologia [39,40,42,45], pneumologia [61], toxicologia [48], neurologia [22], genética médica (erros inatos do metabolismo) [62,63], nefrologia [64], fisiologia [41], nutrição [33], reumatologia (doenças degenerativas) [65,66] e cirurgia (transplante de órgãos) [67,68].

Dentre vários exemplos, três merecem destaque por sua originalidade e repercussão. Em pneumologia, a asma infantil é uma doença de grande prevalência e difícil diagnóstico clínico. Carraro *et al.* [61] analisaram os metabólitos presentes no ar expirado por crianças saudáveis e asmáticas (investigação apelidada pelos próprios autores de “respirômica”, do inglês “*breathomics*”) e conseguiram classificá-las com sucesso.

No ramo da infectologia, a meningite bacteriana é uma patologia emergencial que precisa ser rapidamente distinguida de outras meningites não bacterianas. O teste padrão de identificação do agente etiológico é feito por cultura do líquido cérebro-espinhal que pode levar dias. Analisando o líquido cérebro-espinhal de pacientes em ressonância magnética nuclear, Coen *et al.* [56] conseguiram identificar marcadores metabólicos característicos de meningites bacterianas, fúngicas e virais. Como o prognóstico de pacientes com meningite bacteriana está diretamente relacionado com a rapidez do diagnóstico e o início do tratamento, este estudo pode ser revolucionário para o diagnóstico precoce desta doença.

Já Clayton *et al.* [51], num estudo farmacometabolômico, encontrou uma clara associação entre metabólitos presentes previamente na urina de voluntários que ingeriram paracetamol e as posteriores diferentes vias de metabolização da droga. Este estudo evidenciou como a flora microbiana do trato digestivo pode interferir na resposta de um indivíduo a um medicamento, na eficácia do mesmo e/ou na progressão de uma doença. Enfoques como estes são centrais na busca de uma medicina cada vez mais personalizada.

Ainda que incipientes, vários trabalhos publicados na área da metabolômica clínica apresentam resultados excepcionalmente promissores, seja no diagnóstico e na seleção da terapia [56,59], na avaliação do efeito da terapia escolhida [69] ou na determinação da progressão da doença [70].

### 1.5 A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Ressonância magnética nuclear (RMN) é o nome que se dá à propriedade que o núcleo de alguns átomos possui de absorver e reemitir radiação eletromagnética (“ressonar”) numa frequência específica quando submetido a um campo magnético. A frequência desta radiação ressonante será diretamente proporcional à intensidade do campo magnético, além de depender de propriedades atômicas particulares.

Os núcleos de isótopos que contêm um número ímpar de prótons e/ou nêutrons apresentam momento magnético e momento angular e, portanto, um spin nuclear diferente de zero. Já os núclídeos que têm um número par de prótons e nêutrons exibem um spin nuclear igual a zero e, portanto, não possuem a propriedade da ressonância magnética. Dentre os núclídeos mais comumente estudados estão:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  e  $^{31}\text{P}$  [71].

Inicialmente direcionados à física molecular, a propriedades de cristais, à elucidação da estrutura de proteínas e às técnicas de imagem (imagens por ressonância magnética), os estudos embasados na propriedade da RMN de alguns átomos têm se voltado cada vez mais para outro ramo de investigação biológica: a metabolômica. Neste ramo de pesquisa, o candidato preferencial tem sido o núcleo do átomo de  $^1\text{H}$ , devido a sua grande abundância natural nas moléculas orgânicas [72].

A análise de RMN do hidrogênio presente em soluções orgânicas (chamados “biofluidos”) como urina e plasma sanguíneo [39-42] é bastante sensível (micromolares), não invasiva, não seletiva (todos os compostos de interesse são analisados ao mesmo tempo) e requer um mínimo de pré-tratamento das amostras, além de necessitar de pequenos volumes [71]. A análise de RMN não utiliza radiação ionizante (o que é uma vantagem para aplicações em amostras sensíveis ou em organismos vivos) nem provoca qualquer tipo de reação química, o que permite a preservação de amostras escassas ou raras [72].

O perfil metabolômico pode ser obtido por meio da comparação com sinais de RMN de moléculas individuais, previamente medidos em condições fisiológicas e adicionados a uma biblioteca de metabólitos [73,74]. Dados espectrais dos metabólitos mais comumente encontrados em biofluidos (tais como aminoácidos, carboidratos, lipídeos, etc.) estão disponíveis na literatura científica e fazem parte de bancos de dados integrados a programas para processamento e análise de dados de RMN (Chenomx NMR Suite, Canada; KnowItAll, Bio-Rad, EUA).

Comparando-se os dados clínicos de um grupo de pacientes com seus respectivos perfis metabólicos obtidos por RMN, é possível averiguar suas variações mais relevantes, bem como estabelecer novos indicadores para o seu diagnóstico e prognóstico – uma combinação de informações clínicas e metabolômicas [44,75]. Deste modo, o perfil metabólico de novos pacientes, obtido logo no início do tratamento, poderia ser usado para sua realocação em grupos de risco mais adequado e, portanto, para tratamentos mais específicos e diferenciados [20].

## 1.6 ESTUDOS METABOLÔMICOS EM LEUCEMIAS

Até o presente, poucos são os trabalhos que tratam da interface metabolômica-leucemia, sendo a maioria destes realizada com linhagens celulares.

O estudo pioneiro foi feito com Jurkat, uma linhagem T-derivada de leucemia linfóide aguda (LLA) [76]. Após tratamento com doxorrubicina, foi possível estimar, por RMN, o percentual de células apoptóticas por meio da razão entre as áreas espectrais correspondentes aos picos de metileno ( $\text{CH}_2$ ) e metil ( $\text{CH}_3$ ). Esta razão mostrou-se diretamente proporcional ao percentual de linfoblastos apoptóticos.

A linhagem promielocítica HL60 também foi investigada com relação às suas transformações metabólicas durante o processo de apoptose [77]. Células foram induzidas a entrar em morte celular programada (tratamento com radiação ionizante ou quimioterápico) ou a sofrer necrose por aquecimento. Os espectros de RMN mostraram que a apoptose, provocada tanto por fatores físicos quanto químicos, produz um perfil metabolômico homogêneo, enquanto que a necrose é caracterizada por um comportamento metabólico completamente distinto do apoptótico.

O primeiro estudo que objetivou identificar as respostas metabólicas de linhagens leucêmicas ao tratamento com quimioterápicos foi realizado por Gottschalk *et al.* [78]. Os autores testaram o efeito do mesilato de imatinib em três linhagens de leucemia mielóide crônica (duas BCR-ABL+, sensíveis à droga e uma BCR-ABL-, insensível ao imatinib). O estudo foi feito com  $^{13}\text{C}$ -RMN. Não houve alteração metabólica na linhagem insensível com relação ao seu controle negativo, ao passo que as linhagens BCR-ABL+ apresentaram repressão da via glicolítica e aumento do metabolismo mitocondrial (estímulo do ciclo do ácido cítrico e maior produção de ATP) após incubação com o quimioterápico.

Um segundo estudo que utilizou linhagens de leucemia mielóide crônica tratadas com imatinib observou que uma linhagem sensível à droga (MyL) consumiu mais glicose e produziu mais lactato e alanina comparada a uma linhagem resistente (Myl-R) ao imatinib, que apresentou altas concentrações de creatina e seus derivados [79].

Em 2009, Tiziani *et al.* [80] estudaram o perfil metabólico de três linhagens de leucemia mielóide aguda tratadas por 24h com bezafibrato e acetato de medroxiprogesterona, e concluíram que a diferença metabólica evocada pelos quimioterápicos foi menor do que aquela previamente observada entre as linhagens não tratadas. O tratamento simultâneo com ambas as drogas produziu efeitos metabólicos semelhantes aos observados no tratamento com peróxido de hidrogênio, o que foi atribuído ao seu mecanismo de ação comum, ou seja, à geração de espécies reativas de oxigênio.

Um passo adiante foi dado por Arakaki *et al.* [81]. Estes autores desenvolveram um método computacional de estudo e inferências metabolômicas (“CoMet”) que se mostrou eficiente na identificação de compostos potencialmente relacionados a características celulares. Por exemplo, nove metabólitos foram preditos pelo programa para estarem em menores concentrações em Jurkat quando comparados com linfoblastos normais – de fato, todos confirmaram as predições. Por outro lado, apenas dois de 11 metabólitos preditos para estarem em maiores concentrações na linhagem leucêmica estavam relacionados com a inibição da divisão celular, o que faz sentido quando se leva em consideração a maior taxa de proliferação de linhagens celulares comparadas a linfoblastos normais.

O primeiro trabalho envolvendo metabolômica de blastos de pacientes com leucemia foi feito por Wilson *et al.* [82]. Os autores utilizaram HPLC para quantificar nucleotídeos em células de leucemia linfoblástica crônica, tratadas com cladribina,

fludarabina e desoxicoformicina, identificando, deste modo, uma assinatura (“*fingerprint*”) de cada uma destas drogas no *pool* nucleotídico celular.

A RMN de prótons foi utilizada por MacIntyre *et al.* [83] para determinação de perfis metabolômicos de blastos de pacientes com leucemia linfoblástica crônica (LLC) que apresentavam diferentes genótipos para regiões variáveis da cadeia pesada de imunoglobulina (reconhecidamente de valor prognóstico). Após análise quimiométrica, foi possível estabelecer uma associação entre perfil metabolômico e genótipo. Este trabalho foi o primeiro a vislumbrar que a quantificação de metabólitos poderia ser uma alternativa viável para a estratificação de pacientes com LLC em grupos de risco.

Outro estudo com grande valor prognóstico foi realizado por Cano *et al.* [84], que estudaram a metabolômica de células-tronco hematopoiéticas coletadas no sangue periférico de pacientes com linfoma (Hodgkin e não Hodgkin) antes de passarem por um transplante de medula óssea (TMO) autólogo. Os autores procuraram padrões metabólicos nas células dos pacientes que vieram a apresentar mielodisplasia ou leucemia mielóide aguda até cinco anos após a realização do transplante. Alterações no metabolismo de aminoácidos, de glicolatos, dicarboxilatos, no ciclo do ácido cítrico e na biossíntese de aminoacil-RNA<sub>t</sub> estavam relacionadas com o prognóstico não favorável. Este estudo metabolômico permitiu que um novo olhar fosse lançado sobre a bioquímica celular de pacientes com linfoma e que são submetidos ao TMO: as células-tronco hematopoiéticas de alguns pacientes apresentam disfunções mitocondriais constitutivas, o que faz com que sofram uma ação exacerbada das espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pela quimioterapia e radioterapia para tratamento do tumor. O excesso desses compostos seria responsável por causar mutações no genoma destas células, provocando mielodisplasia ou LMA nestes pacientes.

Todos estes estudos demonstraram a aplicação bem sucedida de abordagens metabolômicas em diferentes subtipos de leucemia, seja em investigações de “*fingerprint*”, ou perfil metabólico gerado por drogas, seja na busca por marcadores prognósticos do tratamento. Nenhum deles, entretanto, estudou a metabolômica de leucemias da infância, ou averiguou os efeitos metabólicos do metotrexato em células leucêmicas.

A proposta deste trabalho, portanto, é investigar as diferenças metabólicas de células sensíveis ou resistentes ao MTX, utilizando como modelos linhagens celulares de

leucemia linfóide aguda. Ainda que, para serem revertidos em aplicações clínicas, os resultados deste estudo tenham de ser validados em amostras de pacientes, o seu êxito em identificar metabólitos indicadores de resistência/sensibilidade ao MTX significará um passo promissor na busca por critérios de estratificação de pacientes, para um tratamento mais especializado e, portanto, mais eficaz.



## **2 – OBJETIVOS**

1. Classificar as linhagens de LLA B- e T-derivadas de que dispomos em laboratório em “sensíveis” ou “resistentes” ao MTX, calculando seus valores de  $IC_{50}$  a doses crescentes do quimioterápico.
2. Determinar as melhores condições de cultura celular referentes à dosagem de MTX, tempo de incubação e investigação intra ou extracelular nas quais as diferenças metabólicas entre linhagens resistentes e sensíveis sejam máximas.
3. Identificar e quantificar os metabólitos das linhagens de LLA cultivadas na presença ou ausência de MTX.
4. Realizar a análise de componentes principais (PCA) e construir um modelo de classificação por meio da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).
5. Identificar os metabólitos relevantes na construção do modelo de classificação das amostras controles ou tratadas com o quimioterápico.
6. Construir curvas ROC e determinar os parâmetros clínicos de um teste diagnóstico típico para estes metabólitos, considerados individual ou coletivamente.
7. Determinar quais metabólitos são potenciais bioindicadores de resistência ou sensibilidade ao MTX.
8. Construir mapas de integração bioquímica para evidenciar particularidades e estabelecer relações gênicas e enzimáticas dos fenótipos estudados visando alvos para futuras intervenções terapêuticas.

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MEIO DE CULTURA

Todas as linhagens de leucemia linfóide foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL penicilina, 100 pg/mL estreptomicina e incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

#### 3.2 ARMAZENAMENTO E DILUIÇÃO DE MTX

Para solubilizar o MTX, foi preparado um tampão alcalino de carbonato de sódio (pH=9,6) composto por 8 ml de solução 0,2 mol/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 17 ml de solução de 0,2 mol/L de NaHCO<sub>3</sub> + 25 ml de H<sub>2</sub>O.

Uma solução estoque de 43,4 mmol/L de MTX foi preparada e armazenada a -20°C. Diluições subseqüentes foram feitas em meio de cultura (RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino) imediatamente antes do uso. Todos os experimentos foram feitos com a mesma solução estoque de MTX, cuja manutenção da atividade quimioterápica foi confirmada por MTT antes e após os mesmos.

#### 3.3 ENSAIOS IN VITRO DE RESISTÊNCIA/SENSIBILIDADE AO MTX PELA REDUÇÃO DO MTT

Metodologia adaptada de Tada *et al.* [85]: as linhagens celulares foram ressuspensas em meio de cultura a uma concentração de 4 x 10<sup>5</sup> células/mL. Oitenta microlitros dessa solução foram semeados em placas de 96 poços de fundo achatado, acrescidos de 20 µL do quimioterápico ou apenas veículo. Cada concentração de quimioterápico (ou veículo) foi feita em triplicata. As placas foram mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48h.

Decorrido este período de incubação, foram adicionados 20 µL de solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) a 5 mg/mL, seguido de mais um período de incubação de 4 horas, nas mesmas condições descritas acima. Na seqüência, foram adicionados 100 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% + HCL 0,01 mol/L, para dissolver os cristais de formazan, produzidos pelas células vivas. Após nova incubação *overnight*, seguiram-se leituras de absorbância a 570 nm – 620 nm.

### 3.4 OBTENÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS

Com o intuito de anular a absorbância do *background*, foi subtraído, de todos os poços, o valor médio de absorbância de poços que continham apenas meio de cultura. A seguir, foi extraída a razão entre o valor de absorbância de cada poço pelo valor médio de absorbância dos poços com células sem quimioterápico (controles), obtendo-se, assim, os percentuais de sobrevivência celular para cada concentração de MTX. As curvas de sobrevivência foram construídas e os valores de IC<sub>50</sub> calculados com auxílio do software Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

### 3.5 CULTIVO DAS LINHAGENS COM MTX

As linhagens celulares foram mantidas em “garrafas estoque” incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em fase exponencial de crescimento, 2 x 10<sup>8</sup> células foram retirados do “estoque” e ressuspensos em 200 mL de meio de cultura fresco, os quais foram igualmente fracionados em duas garrafas grandes para cultura celular (Sarstedt – 175 cm<sup>2</sup> de área de cultura). Após 12h de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, o MTX diluído em RPMI foi adicionado a uma das garrafas (para uma concentração final de 25 nmol/L), sendo que o mesmo volume de veículo foi adicionado à outra garrafa (controle negativo). Após leve agitação para homogeneização do quimioterápico, seguiu nova incubação por 24h. Em todas as etapas de incubação, as garrafas foram mantidas em posição horizontal, de modo a aumentar a superfície de contato do meio de cultura com o ar, facilitando a troca gasosa. Decorrido este tempo, as garrafas foram retiradas da estufa incubadora e seus conteúdos, centrifugados (1.200 rpm por 10 min). Parte do sobrenadante foi coletado para futura análise e o restante, descartado. As células foram ressuspensas em 15 mL de tampão PBS, novamente centrifugadas e o pellet formado, após breve agitação, armazenado a -80°C.

### 3.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO CELULAR

Os extratos celulares foram obtidos segundo o método de Le Belle [86], utilizando-se metanol e clorofórmio (M/C). O método consiste em adicionar 1,667 ml de metanol + 0,833 ml de clorofórmio (ambos a 4°C) ao pellet de 10<sup>8</sup> células congelado em tubo Falcon. A mistura foi processada no equipamento de ultrassom (Sonics Vibra Cell) por 3 min, com

intervalos de 15 segundos entre cada minuto. Em seguida, foram adicionados 1,250 ml de água Milli Q + 1,250 ml de clorofórmio (ambos a 4°C). Após breve homogeneização, a mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 20 min e a 4°C. Foram coletados 2,6 ml do sobrenadante (fase aquosa contendo água, metanol e metabólitos polares), que permaneceram em dessecador de laboratório à temperatura ambiente por 48h para evaporação do metanol. Após esta etapa, o volume restante (basicamente composto por água) foi liofilizado.

Esta etapa de dessecação foi inserida neste protocolo, pois o condensador do liofilizador de que dispúnhamos opera a uma temperatura de -80°C; como a temperatura de fusão do metanol é -98°C, o sobrenadante (água + metanol) rapidamente descongelava, provocando borbulhamento com perda de amostra. Esta etapa de dessecação é dispensável se se dispõe de um liofilizador cujo condensador opere a uma temperatura mais baixa que a da fusão do metanol.

### 3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA LEITURA NO ESPECTRÔMETRO DE RMN

Ainda que os valores de pH não acarretem problemas com relação à aquisição do espectro em si, eles podem tornar confusa ou enganosa a tarefa de identificação de metabólitos, uma vez que o pH acaba por alterar seus deslocamentos químicos.

Após vários testes, optamos por um tampão de fosfato (10 vezes concentrado) com  $2,8 \times 10^{-1}$  mol/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $7,2 \times 10^{-1}$  mol/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  diluído em água deuterada, que proporcionava uma redução do pH das amostras para valores próximos a 7,40-7,45. Esta faixa de pH apresenta duas vantagens:

- O software Chenomx opera com duas bibliotecas de metabólitos dependentes do pH da amostra: uma ideal para amostras com pH entre 6-8, e outra para pH entre 4-9. A diferença fundamental entre elas é que esta última dá ao usuário uma maior liberdade no ajuste dos picos ao longo do espectro, o que, de certa maneira, pode contribuir para qualificações e quantificações incorretas (“*mismatches*”); com a primeira biblioteca, este tipo de erro é minimizado;

- A faixa de pH obtida está contida na faixa de pH normal do plasma sanguíneo humano, o qual varia entre 7,35 e 7,45 [87]. Esta proximidade permite comparações com amostras de plasma sanguíneo de pacientes em estudos futuros.

Para referência de concentração (visando a quantificação dos metabólitos) foi preparada uma solução estoque de TSP (ácido 3-(trimetil-silil)-2,2',3,3'-tetraadeuteropropiônico ou TMSP-d4) a 50 mmol/L em D<sub>2</sub>O, armazenada ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

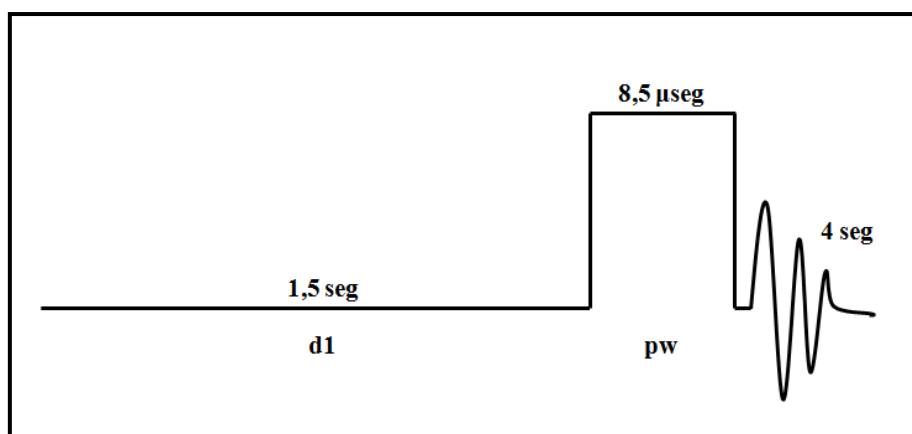
Desta forma, os extratos celulares liofilizados foram ressuspensos em:

- 540μL de D<sub>2</sub>O (dissolução do liofilizado);
- 60μL de tampão fosfato 1 mol/L em D<sub>2</sub>O (padronização do pH);
- 6,06μL de solução de TSP 50 mmol/L (referência interna);

O resultado foi uma solução final de 600,6μL em D<sub>2</sub>O, com concentrações de 0,5mmol/L de TSP e 100mmol/L de tampão fosfato.

### 3.8 PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE RMN

A sequência de pulsos “1Dpresat” (Figura 01) é a mais usual das sequências de pulsos de uma dimensão e foi empregada neste trabalho. Foram realizados 256 scans, com intervalos entre scans (“*delays*”) de 1,5 segundos, janela de leitura de 16 ppm, tempo de aquisição de 4 segundos e 25° C de temperatura.



**Figura 01.** Sequência de pulsos “1Dpresat”.

### 3.9 ANÁLISES MULTIVARIADAS (PCA E PLS-DA) E CURVAS ROC

As análises multivariadas foram feitas com auxílio do software Pirouette (v. 4.0, Infometrix Inc., Bothell, Washington, EUA) e da plataforma online MetaboAnalyst [88].

Nas análises por PCA e PLS-DA, as concentrações dos metabólitos foram *autoescaladas* por variarem em grande magnitude entre si (por exemplo, enquanto as concentrações de 2-metilglutarato oscilavam em torno de 30 nmol/L, as de glutamato variavam entre 0,5 – 4,7 mmol/L). Por esta técnica de pré-processamento, cada valor de variável para uma amostra específica foi substituída pela diferença entre ele e a média de todos os valores amostrais para aquela variável, seguido da divisão pela variância desse conjunto de dados. Este tipo de pré-processamento tornou os dados padronizados e as variáveis, comparáveis entre si.

Conforme relatado, as amostras deste trabalho foram compostas pelo extrato celular de  $10^8$  células, sendo estas sonicadas e ressuspensas (após liofilização) sempre em um mesmo volume de solvente. Desta forma, linhagens de maior volume celular produziram espectros com sinais mais intensos (para todos os metabólitos) do que linhagens de menor volume celular, pois extratos oriundos das primeiras culminavam em amostras mais concentradas que os das segundas. Para anular essa variação, as amostras foram transformadas pela *normalização pela área* (ou “divisão pela 1ª normalização da amostra”). Neste tipo de normalização, cada valor de variável de uma amostra foi dividido pela somatória dos valores de todas as variáveis daquela mesma amostra. Este tipo de transformação normalizou as amostras e as tornou comparáveis entre si.

As curvas ROC foram construídas com o auxílio do software MATLAB R2010b (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, EUA), utilizando a rotina de programação desenvolvida por Cardillo [89].

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

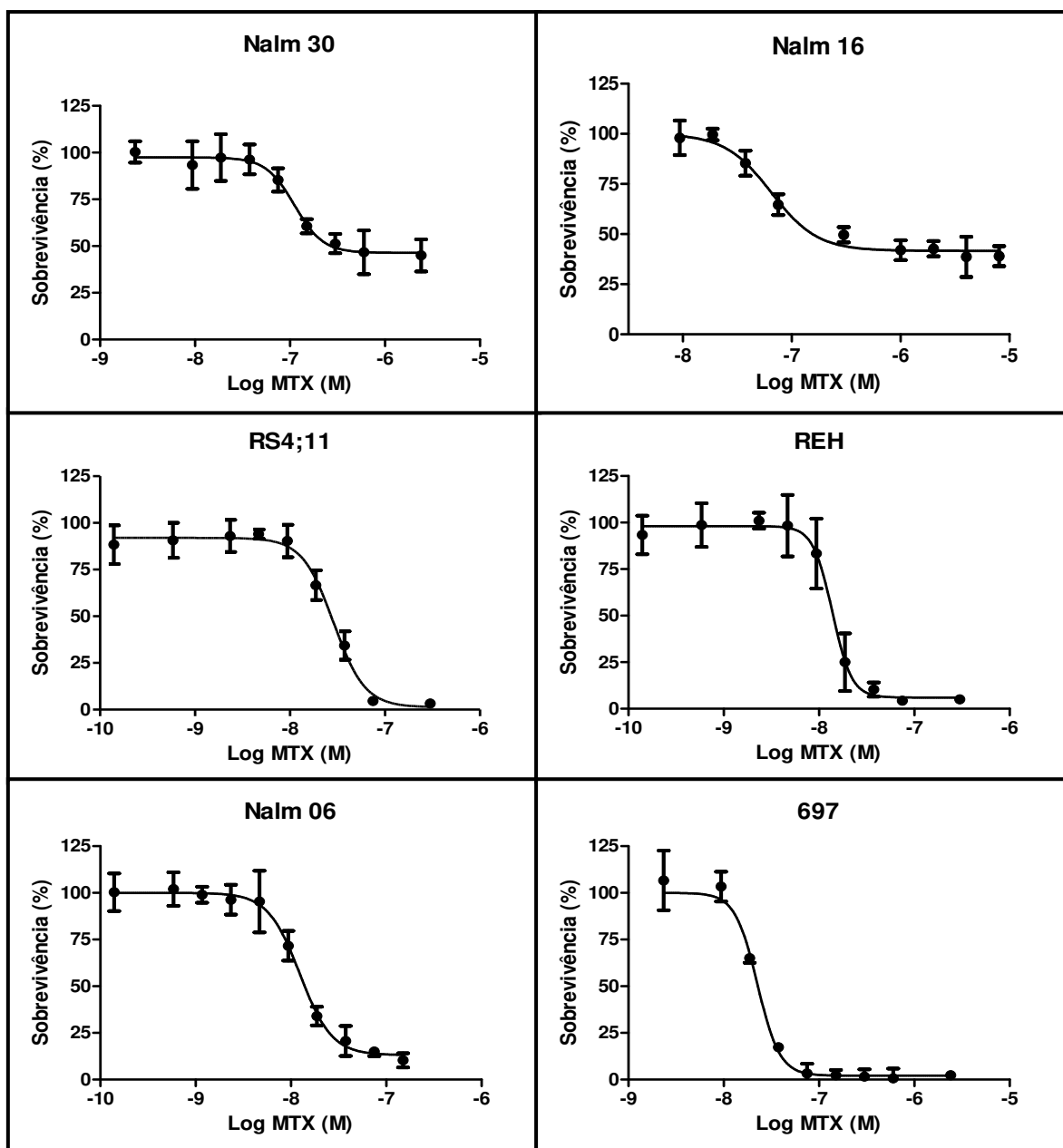
### 4.1 OBTENÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA A DOSES CRESCENTES DE METOTREXATO

As curvas de sobrevivência a doses crescente de MTX foram obtidas pelo método de redução do MTT, após 48h de tratamento com diferentes concentrações da droga. Cinco linhagens entre B- e T-derivadas apresentaram uma alta porcentagem de sobrevivência (cerca de 50%) até mesmo em elevadas concentrações de MTX: as B-derivadas Nalm 16 e Nalm 30 e as T-derivadas HPB-ALL, P12-ICHIKAWA e ALL-SIL, que foram classificadas como resistentes.

As demais linhagens apresentaram baixos percentuais de sobrevivência (cerca de 10-20%) em altas concentrações de MTX e foram classificadas como sensíveis. São elas: as B-derivadas RS4;11, 697, REH e Nalm 06; e as T-derivadas SUP-T1, CCRF-CEM, Jurkat-ECII, MOLT-4 e TALL-1 (Tabela 01). As Figuras 02 e 03 ilustram as curvas de sobrevivências das linhagens B- e T- derivadas, respectivamente.

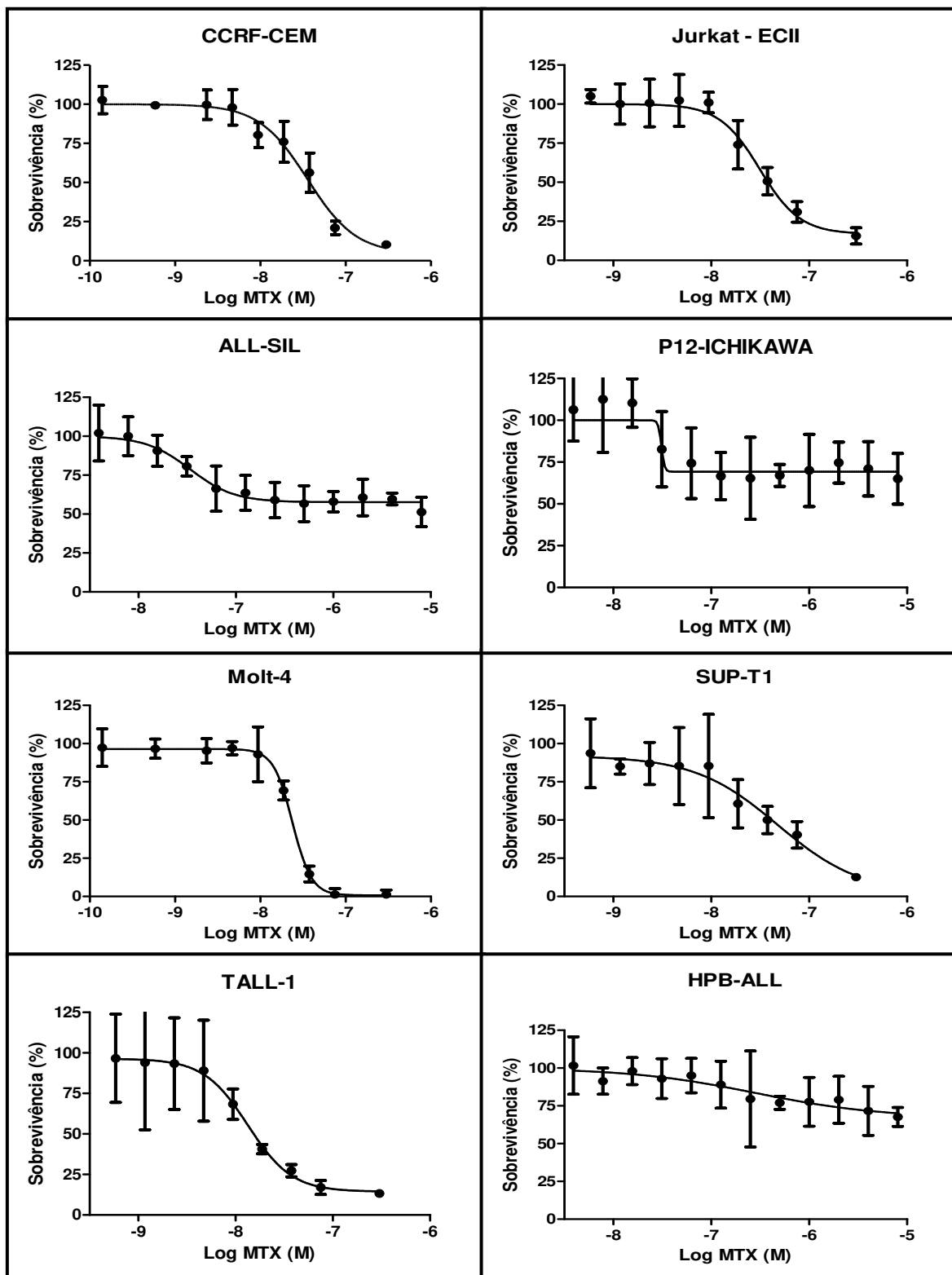
Algumas linhagens resistentes apresentaram um  $IC_{50}$  menor do que algumas linhagens classificadas como sensíveis. Entretanto, por levar em consideração o *comportamento* celular, este critério parece mais apropriado para a classificação das linhagens do que a feita exclusivamente com base no valor numérico do  $IC_{50}$ .

Um levantamento de atributos das linhagens foi feito na literatura científica para excluir a possibilidade das linhagens classificadas como sensíveis ou resistentes ao MTX apresentarem alguma característica genética em comum, que pudesse justificar ou mesmo prever o seu comportamento com relação à droga. Ainda que o compartilhamento desta(s) característica(s) não invalidasse este estudo, a ausência de uma “identidade genética” das classes apenas reafirmaria a relevância de se buscar marcadores metabólicos para a resistência/sensibilidade ao MTX. As Tabelas 05 e 06 (APÊNDICE 2) trazem as informações genéticas e clínicas das linhagens classificadas como resistentes e sensíveis, respectivamente. É possível constatar que, dentre as principais características levantadas, parece não haver qualquer uma que seja marcante e comum às linhagens de cada grupo.



**Figura 02.** Sobrevivência de linhagens de LLA B-derivadas após 48h de tratamento com doses crescentes de MTX. As linhagens Nalm 16 e Nalm 30 apresentaram alta taxa de sobrevivência em todas as concentrações testadas.





**Figura 03.** Sobrevivência de linhagens de LLA T-derivadas após 48h de tratamento com doses crescentes de MTX. As linhagens ALL-SIL, P12-ICHIKAWA e HPB-ALL apresentaram alta taxa de sobrevivência em todas as concentrações testadas.

**Tabela 01.** Valores decrescentes de IC<sub>50</sub> e classificação relativa das linhagens quanto à resistência/sensibilidade ao MTX após 48h de tratamento com a droga.

| Linhagens          | IC <sub>50</sub> (nmol/L) | Classificação |
|--------------------|---------------------------|---------------|
| <b>B-derivadas</b> |                           |               |
| Nalm 30            | 111,4                     | Resistente    |
| Nalm 16            | 65,13                     | Resistente    |
| RS4;11             | 28,7                      | Sensível      |
| 697                | 22,6                      | Sensível      |
| REH                | 13,7                      | Sensível      |
| Nalm 06            | 12,4                      | Sensível      |
| <b>T-derivadas</b> |                           |               |
| HPB-ALL            | 284,3                     | Resistente    |
| SUP-T1             | 47,6                      | Sensível      |
| CCRF-CEM           | 35,6                      | Sensível      |
| ALL-SIL            | 33,8                      | Resistente    |
| JURKAT-ECII        | 31,2                      | Sensível      |
| P-12 ICHIKAWA      | 30,9                      | Resistente    |
| MOLT-4             | 23,8                      | Sensível      |
| TALL-1             | 13,4                      | Sensível      |

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DO MELHOR TEMPO DE TRATAMENTO, DOSAGEM DE MTX E ESCOLHA ENTRE ANÁLISE INTRA OU EXTRACELULAR

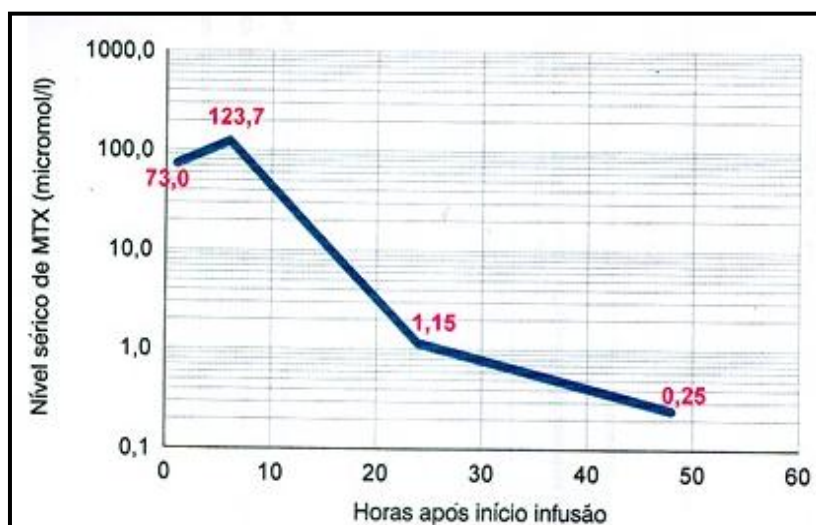
Antes de se realizar o estudo com todas as linhagens, foram testados, em uma linhagem resistente ao MTX (HPB-ALL) e uma sensível (MOLT-4), dois tempos de tratamento e duas concentrações de MTX para averiguação das condições nas quais as diferenças metabólicas entre estas linhagens fossem maximizadas. Foram analisados o meio de cultura e o extrato celular destas linhagens, cultivadas por dois períodos de tempo: 6h e 24h.

Duas dosagens de MTX foram testadas: a primeira de  $2,5 \times 10^{-8}$  mol/L, que corresponde a um valor de concentração de MTX que segregou satisfatoriamente as linhagens sensíveis das resistentes com base em seus valores de  $IC_{50}$ . A segunda dosagem foi  $6,5 \times 10^{-5}$  mol/L. Esta é a concentração aproximada de MTX encontrada na hora “10” no plasma sanguíneo de pacientes que estejam sendo medicados com este quimioterápico em infusão de 6 horas (Figura 04) [90].

Esta dosagem foi escolhida por se tratar de um valor intermediário à máxima concentração de MTX observada ( $1,23 \times 10^{-4}$  mol/L, à hora “6”) e aos  $1,15 \times 10^{-6}$  mol/L da hora “24”, a partir da qual a taxa de excreção do MTX diminui consideravelmente; ela representou uma espécie de valor médio para este período de 24h, das quais aproximadamente metade é marcada por uma concentração sérica de MTX maior que  $6,5 \times 10^{-5}$  mol/L e a outra metade, por uma menor. Esta dosagem representou a intenção de simular, simplificadamente, as condições séricas de um paciente durante as primeiras 24h de infusão do quimioterápico.

Foram também analisadas as amostras cultivadas na ausência de MTX (controles).

Após a determinação dos perfis metabólicos, foram feitas regressões lineares com os valores de concentração dos metabólitos quantificados em MOLT-4 e HPB-ALL, quando submetidas às mesmas condições de tratamento. Nestas regressões, cada ponto correspondia a um metabólito específico, cuja coordenada cartesiana eram os valores logarítmicos de sua concentração. Por exemplo, a coordenada cartesiana do malato intracelular, nas linhagens tratadas com  $6,5 \times 10^{-5}$  mol/L de MTX por 6 horas seria: ((log[malato intracelular em MOLT-4]); (log[malato intracelular em HPB-ALL])).



**Figura 04.** Curva esperada dos níveis séricos de MTX em infusão de 6 horas [90].

Os coeficientes de correlação linear destas regressões nos serviram de critério para a escolha das condições de tratamento que seriam padronizadas: menores coeficientes de correlação indicariam maior dissimilaridade entre os dados e corresponderiam, portanto, aos perfis metabólicos com maiores diferenças entre si (Tabela 02 e Figura 05).

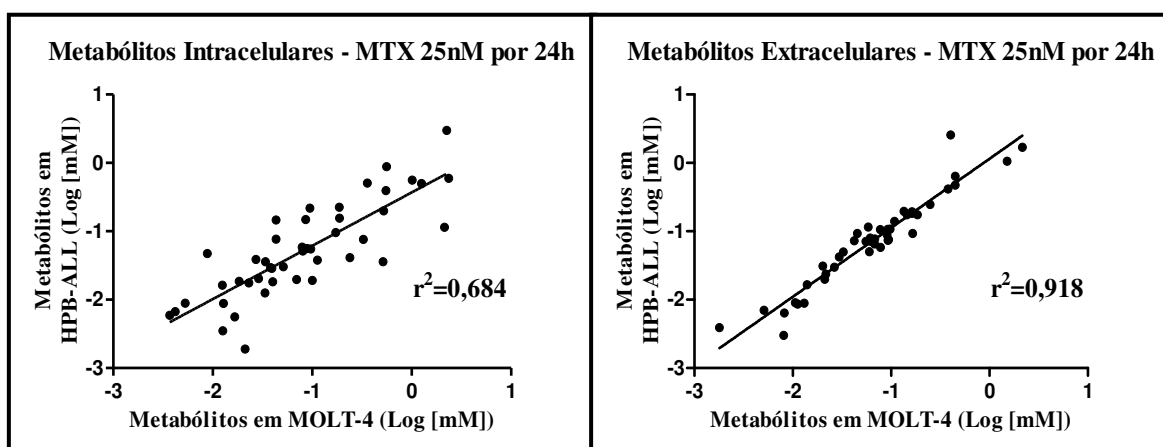
As máximas diferenças metabólicas foram evocadas intracelularmente, após tratamento com 25 nM de MTX por 24h. Ainda que, para o mesmo tempo e dose de MTX, as concentrações dos metabólitos extracelulares também tenham refletido a ação do quimioterápico, elas pareceram ser menos discriminativas que os valores intracelulares. Nesta dosagem, as discrepâncias metabólicas entre o metaboloma intracelular (“*fingerprint*”) e o extracelular (“*footprint*”) podem ter sido ocasionadas pelo mecanismo antimetabólico intracelular do MTX (com inibição da síntese de DNA, RNA, timidilatos e proteínas) que é diferencial entre as linhagens resistentes e sensíveis.

É plausível sugerir que o mesmo efeito não tenha sido observado na concentração de 65  $\mu$ M devido a um efeito citotóxico: nesta dosagem de quimioterápico, a resposta de linhagens sensíveis ou resistentes deixou de ser diferencial.

Desta forma, foi adotada como condição de tratamento a dose de 25 nM de MTX por 24h, sendo priorizada a análise do conteúdo intracelular das linhagens.

**Tabela 02.** Coeficientes de correlação (“ $r^2$ ”) obtidos em regressões lineares entre o conjunto de metabólitos quantificados intra e extracelularmente em uma linhagem sensível (MOLT-4) e uma resistente (HPB-ALL) ao MTX nas condições descritas.

| Tempo    | Dose de MTX | $r^2$ para conteúdo intracelular | $r^2$ para conteúdo extracelular |
|----------|-------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 6 horas  | Controles   | 0,893                            | 0,913                            |
|          | 65 $\mu$ M  | 0,862                            | 0,973                            |
|          | 25 nM       | 0,760                            | 0,940                            |
| 24 horas | Controles   | 0,911                            | 0,971                            |
|          | 65 $\mu$ M  | 0,886                            | 0,983                            |
|          | 25 nM       | 0,684                            | 0,918                            |



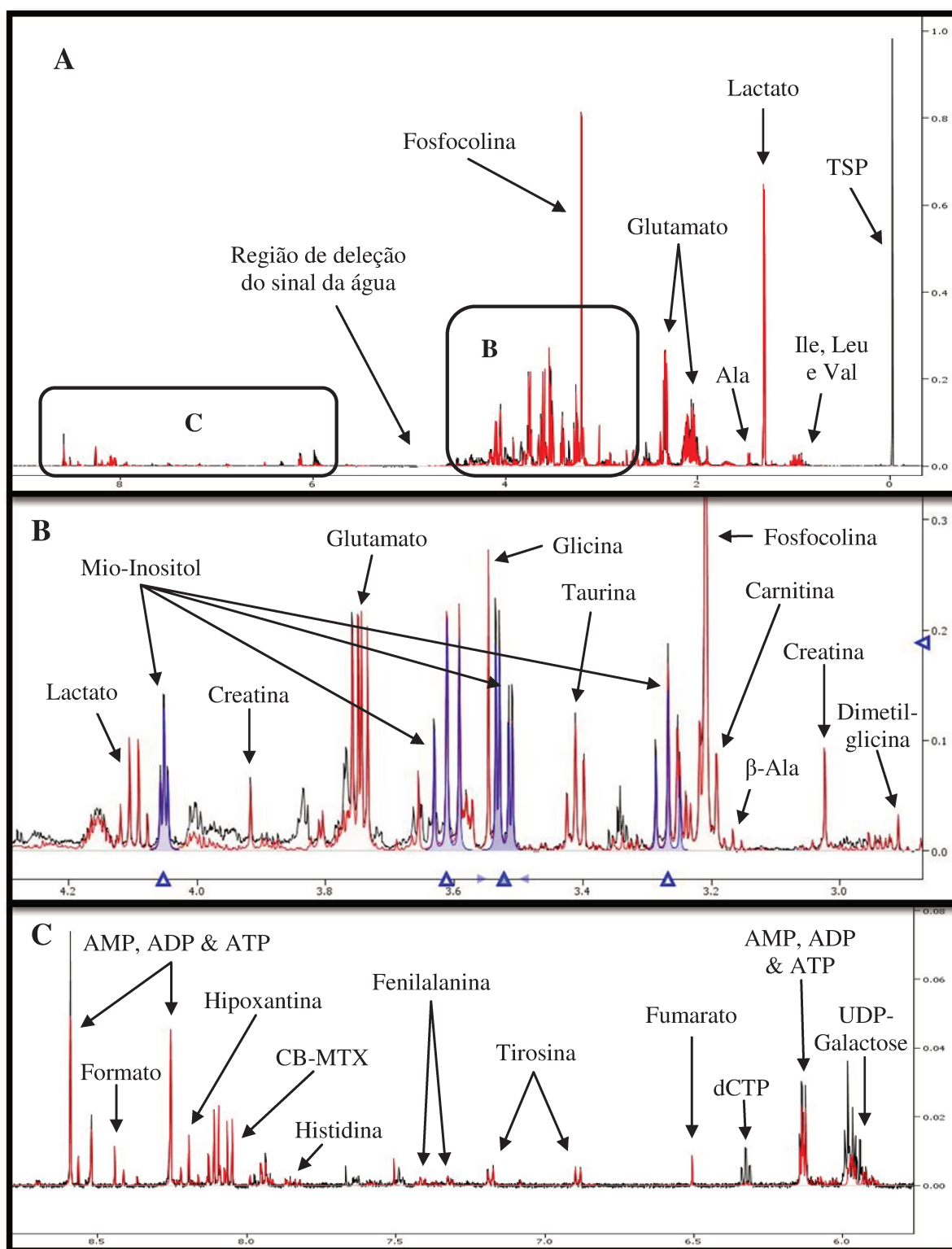
**Figura 05.** Regressão linear a partir dos logaritmos das concentrações de metabólitos intra (esquerda) e extracelulares (direita) quantificados em linhagens MOLT-4 e HPB-ALL tratadas com 25nM de MTX por 24h. O menor coeficiente de correlação linear indicou que, nestas condições de tratamento, a maior diferença metabólica entre as linhagens era intracelular.

### 4.3 ESPECTROS E METABÓLITOS

No total, foram analisados 83 espectros (a primeira réplica controle da linhagem SUP-T1 foi perdida), sendo identificados e quantificados 72 metabólitos. Outros 12 compostos foram desenhados com auxílio do software Chenomx para quantificarem, de um modo relativo, sinais presentes nos espectros para os quais não havia correspondência na biblioteca do software. Estes compostos receberam o nome de “CB” (de “*compound built*”), seguido de uma numeração identificadora. Ao total, foram considerados, portanto, 84 metabólitos na análise de conteúdo intracelular das linhagens (Quadro 01). A Figura 06 exemplifica um espectro obtido.

**Quadro 01.** Metabólitos considerados na análise de conteúdo intracelular das linhagens.

| Metabólitos Intracelulares |                  |                               |                         |
|----------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 2-Metilglutarato           | Creatina         | Leucina                       | Tirosina                |
| 2-Oxibutirato              | dCTP             | Lisina                        | Trans-4-hidroxi-prolina |
| 2-Oxiglutarato             | Dimetilglicina   | Malato                        | Treonina                |
| 3-Hidroxi-isovalerato      | Etanol           | Malonato                      | Trimetilamina           |
| 4-Aminobutirato            | Etilenoglicol    | Metionina                     | UDP-galactose           |
| 4-Hidroxi-fenilacetato     | Fenilalanina     | Mio-inositol                  | UDP-glicose             |
| 5,6-Dihidrotimina          | Formato          | NAADP                         | UDP-glucuronato         |
| Acetato                    | Fosfocolina      | NAD+                          | Uridina                 |
| ADP                        | Fosfoetanolamina | NADP+                         | Valina                  |
| Alanina                    | Fumarato         | Niacinamida                   | CB-01                   |
| AMP                        | Glicina          | O-Acetilcarnitina             | CB-02                   |
| ATP                        | Glicocolato      | Ornitina                      | CB-05                   |
| Arginina                   | Glutamato        | Oxipurinol                    | CB-06                   |
| Asparagina                 | Glutamina        | Piroglutamato                 | CB-08                   |
| Aspartato                  | Glutaciona       | Prolina                       | CB-09                   |
| Beta-Alanina               | GTP              | Propionato                    | CB-15                   |
| Carnitina                  | Guanosina        | S-Adenosil-homocisteína (SAH) | CB-16                   |
| Citidina                   | Hipoxantina      | Sarcosina                     | CB-17                   |
| Citrato                    | Histidina        | sn-Glicero-3-fosfocolina      | CB-21                   |
| Colato                     | Isoleucina       | Succinato                     | CB-MTX                  |
| Colina                     | Lactato          | Taurina                       | CB-MTX2                 |



**Figura 06.** (A) Exemplo de um espectro de RMN. (B) e (C): ampliação das respectivas regiões do espectro destacadas em (A). Nas três regiões espectrais estão apontados os sinais dos principais compostos.

#### 4.4 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA (PCA E PLS-DA)

Os resultados apresentados nesta seção referem-se à análise conjunta de linhagens B- e T-derivadas. Ao todo, cinco linhagens resistentes foram comparadas com nove linhagens sensíveis ao MTX, quando tratadas ou não com o quimioterápico.

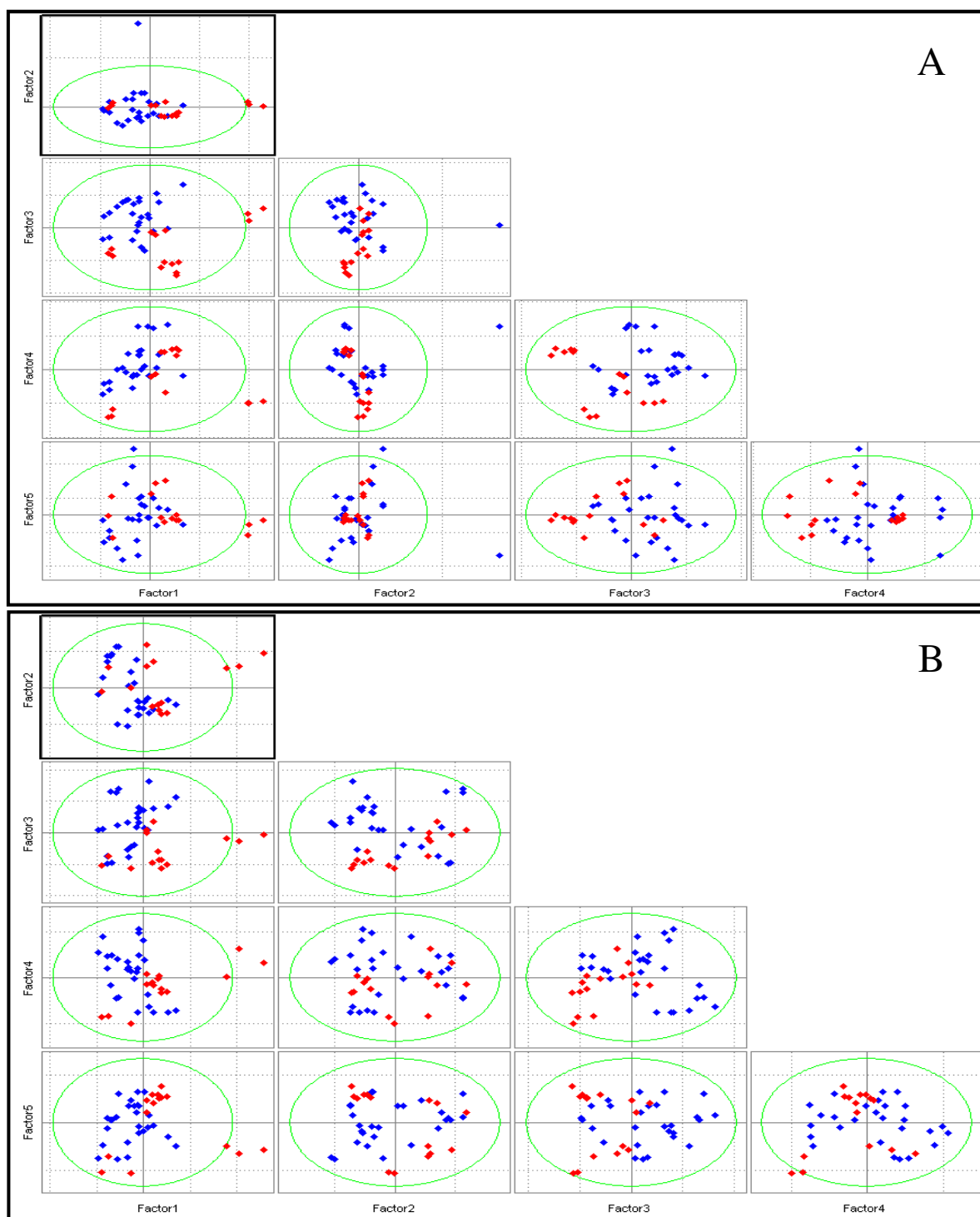
A análise de componentes principais (PCA) é uma ferramenta estatística exploratória não-supervisionada que agrupa as amostras de acordo com suas maiores similaridades. Os gráficos de PCA, portanto, não refletem necessariamente a segregação originalmente buscada, mas sim a mais significativa do ponto de vista estatístico.

De fato, a análise de PCA para as amostras controles ou tratadas não segregou linhagens sensíveis de resistentes, indicando que as diferenças metabólicas associadas ao caráter de resistência/sensibilidade, se existentes, não constaram entre as maiores diferenças metabólicas encontradas. A Figura 07 traz os gráficos de PCA obtidos no software Pirouette; a Figura 08 exhibe gráficos bi e tridimensionais originados pela plataforma metabolômica online MetaboAnalyst [88].

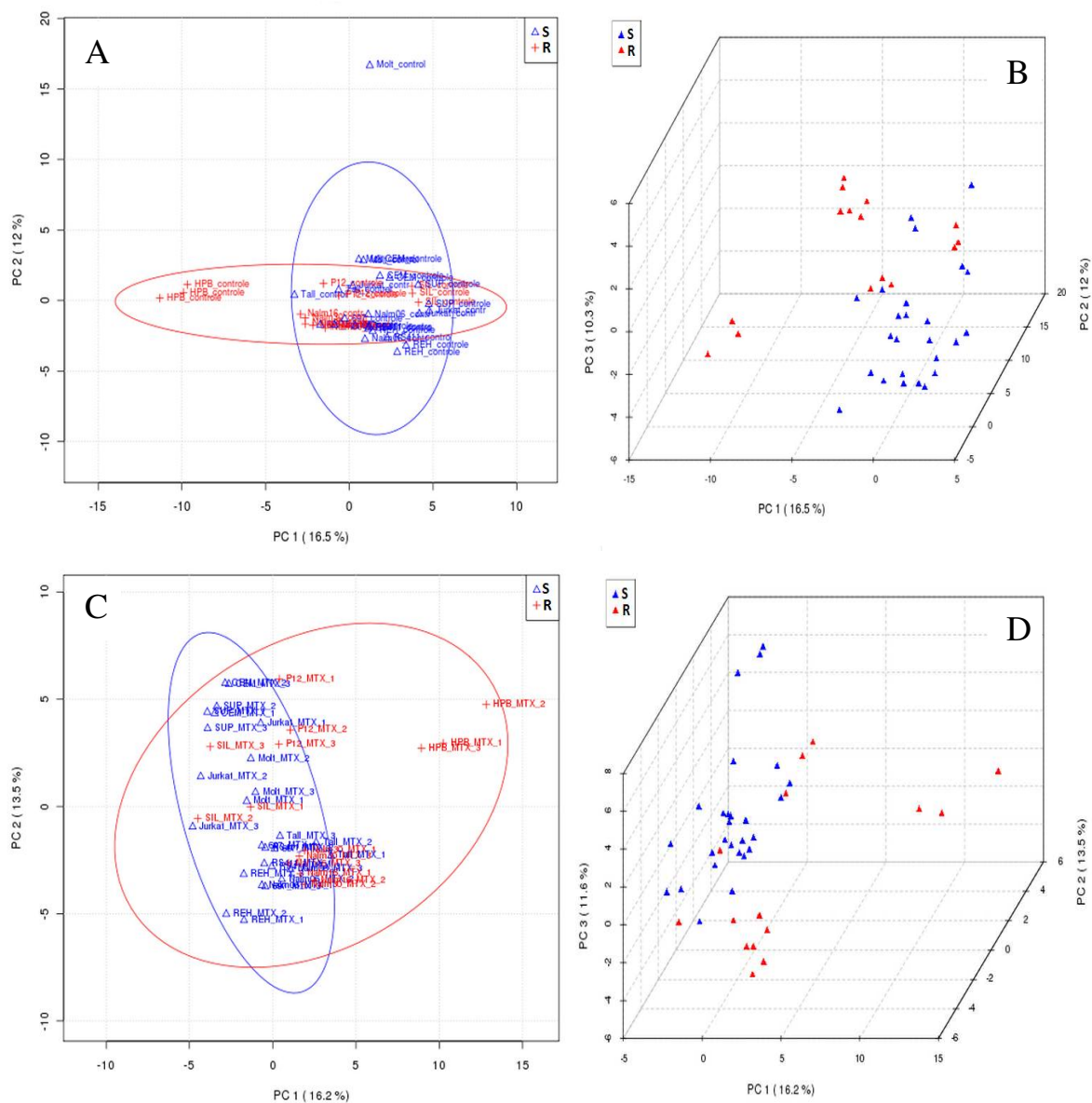
Por outro lado, a análise de discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) é uma técnica para redução de dimensão informacional que busca evidenciar similaridades ou diferenças específicas, por meio da organização preferencial de componentes principais que se mostrem correlacionadas com uma variável classificatória de interesse (no caso, a resistência ou sensibilidade ao MTX, averiguada *in vitro* previamente). Ao contrário da PCA, o PLS-DA é um método supervisionado de reconhecimento de padrões que constrói modelos classificatórios com redução de variáveis e que visa caracterizar as classes consideradas para nelas inserir novas amostras (capacidade preditiva).

No PLS-DA, há duas medidas importantes para as variáveis: “importância da variável na projeção” (“*variable importance in projection*” – VIP) e “medida de importância baseada no coeficiente” (“*coefficient-based importance measure*”). A primeira é uma soma de quadrados ponderada (entre todas as variáveis “X”) que leva em consideração a quantidade de explicação, em cada dimensão, da variação em “Y”. A segunda é baseada na soma ponderada dos coeficientes de regressão absolutos. Como em ambos os índices foi obtido um resultado muito semelhante, optamos por explorar apenas o índice VIP.





**Figura 07.** Componentes principais (PC's) obtidas no software Pirouette para as triplicatas de linhagens sensíveis (em azul) e resistentes ao MTX (em vermelho), cultivadas na ausência (A) ou presença do quimioterápico (B). A análise por PCA não segregou de modo satisfatório, em nenhum dos casos, linhagens sensíveis de resistentes, indicando que as diferenças metabólicas associadas a essa característica, se existentes, não constaram entre as maiores diferenças metabólicas encontradas.



**Figura 08.** Representação bi e tridimensional da análise de PCA para amostras controles (A e B) e tratadas com MTX (C e D) pela plataforma MetaboAnalyst. Em ambos os casos não é possível segregar linhagens sensíveis de resistentes nas três primeiras componentes principais. As elipses em A e C representam os intervalos de confiança de 95%.

As Figuras 09 e 10 trazem os gráficos do modelo PLS-DA construídos para as amostras controles e tratadas com MTX, respectivamente. Construídos os modelos, averiguamos qual o número de variáveis latentes (LV) mais apropriado. É considerado ideal o menor valor possível de LV, a partir do qual não haja mais ganho substancial na acurácia do modelo, em seu coeficiente de calibração (rCal) ou de validação (rVal). A

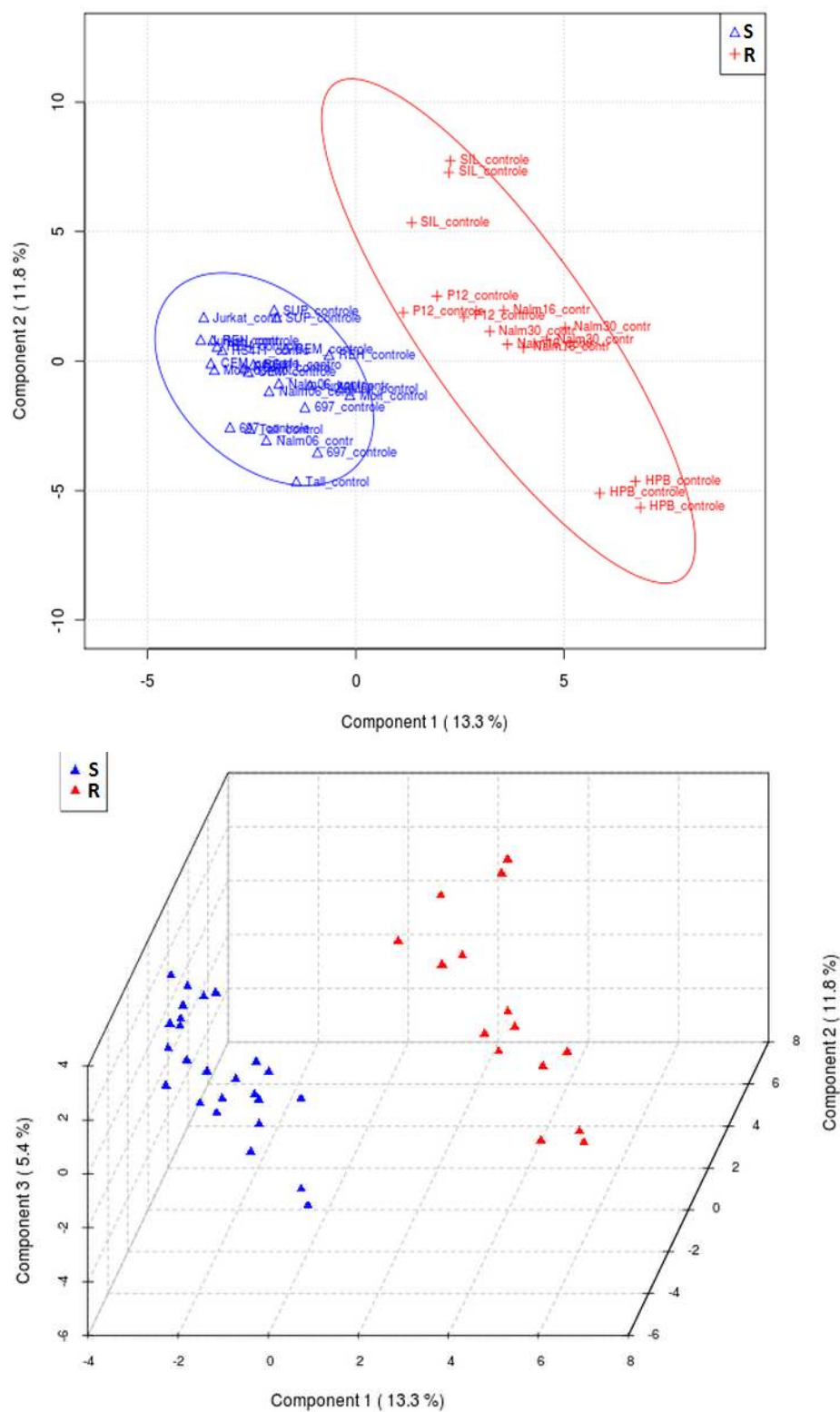
opção por um número maior de LV's culmina na inclusão de informações desnecessárias ao modelo, tornando-o “superajustado” e comprometendo, portanto, sua capacidade preditiva.

A Tabela 03 traz os índices obtidos para os modelos de classificação construídos com amostras controles ou tratadas. Para ambos os modelos, o número de três variáveis latentes foi considerado apropriado.

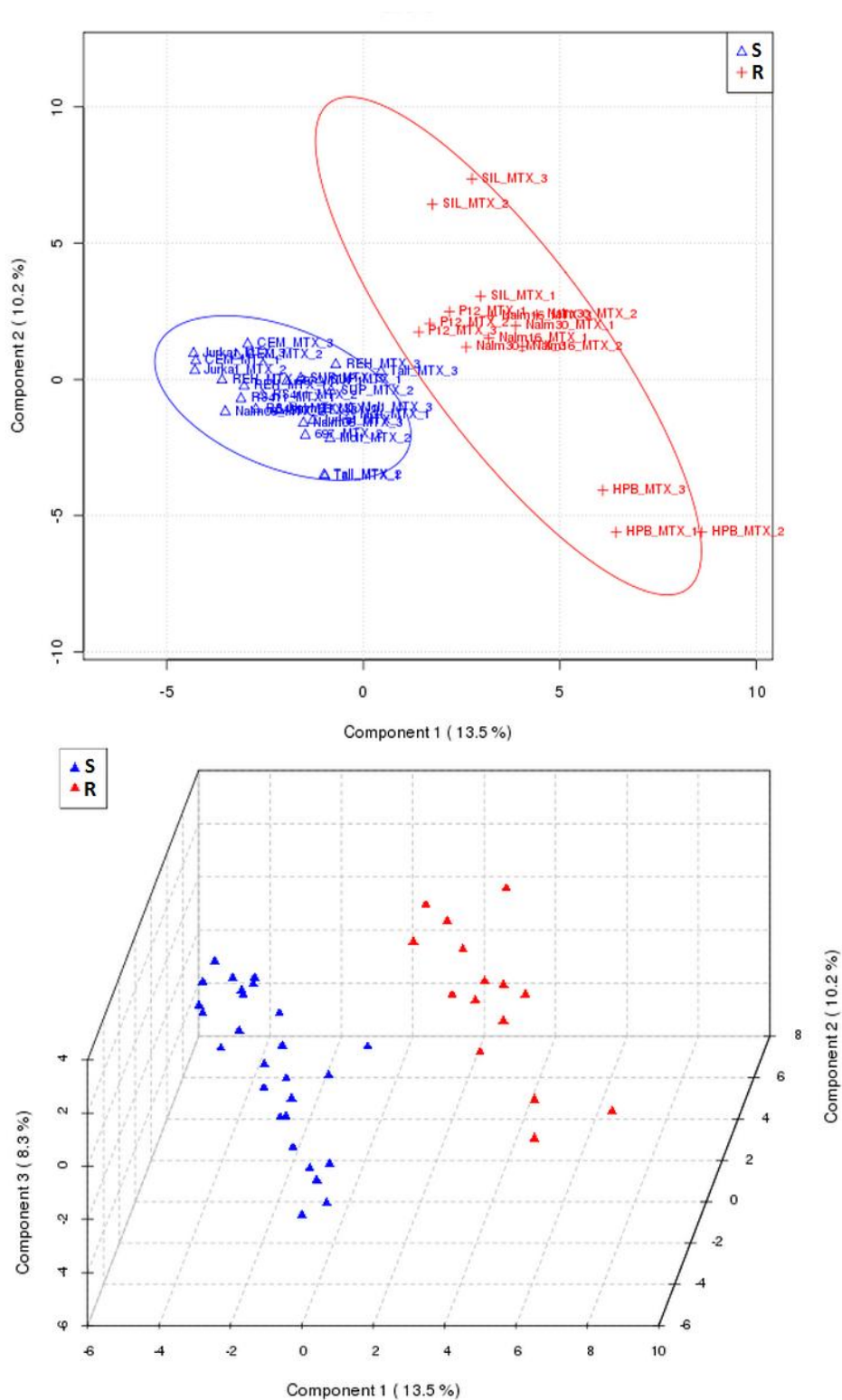
**Tabela 3.** Índices obtidos para os modelos de PLS-DA de amostras controles e tratadas. Em ambos, o número de três variáveis latentes (LV's), em destaque, foi considerado apropriado.

| <b>CONTROLES</b> | 1 LV  | 2 LV's | <b>3 LV's</b> | 4 LV's | 5 LV's |
|------------------|-------|--------|---------------|--------|--------|
| <b>Acurácia</b>  | 0.890 | 0.945  | <b>1.0</b>    | 1.0    | 1.0    |
| <b>rCal</b>      | 0.812 | 0.912  | <b>0.960</b>  | 0.973  | 0.977  |
| <b>rVal</b>      | 0.694 | 0.815  | <b>0.863</b>  | 0.876  | 0.880  |
| <b>TRATADAS</b>  | 1 LV  | 2 LV's | <b>3 LV's</b> | 4 LV's | 5 LV's |
| <b>Acurácia</b>  | 0.779 | 0.896  | <b>0.948</b>  | 0.948  | 0.948  |
| <b>rCal</b>      | 0.756 | 0.886  | <b>0.933</b>  | 0.956  | 0.970  |
| <b>rVal</b>      | 0.628 | 0.750  | <b>0.799</b>  | 0.807  | 0.800  |

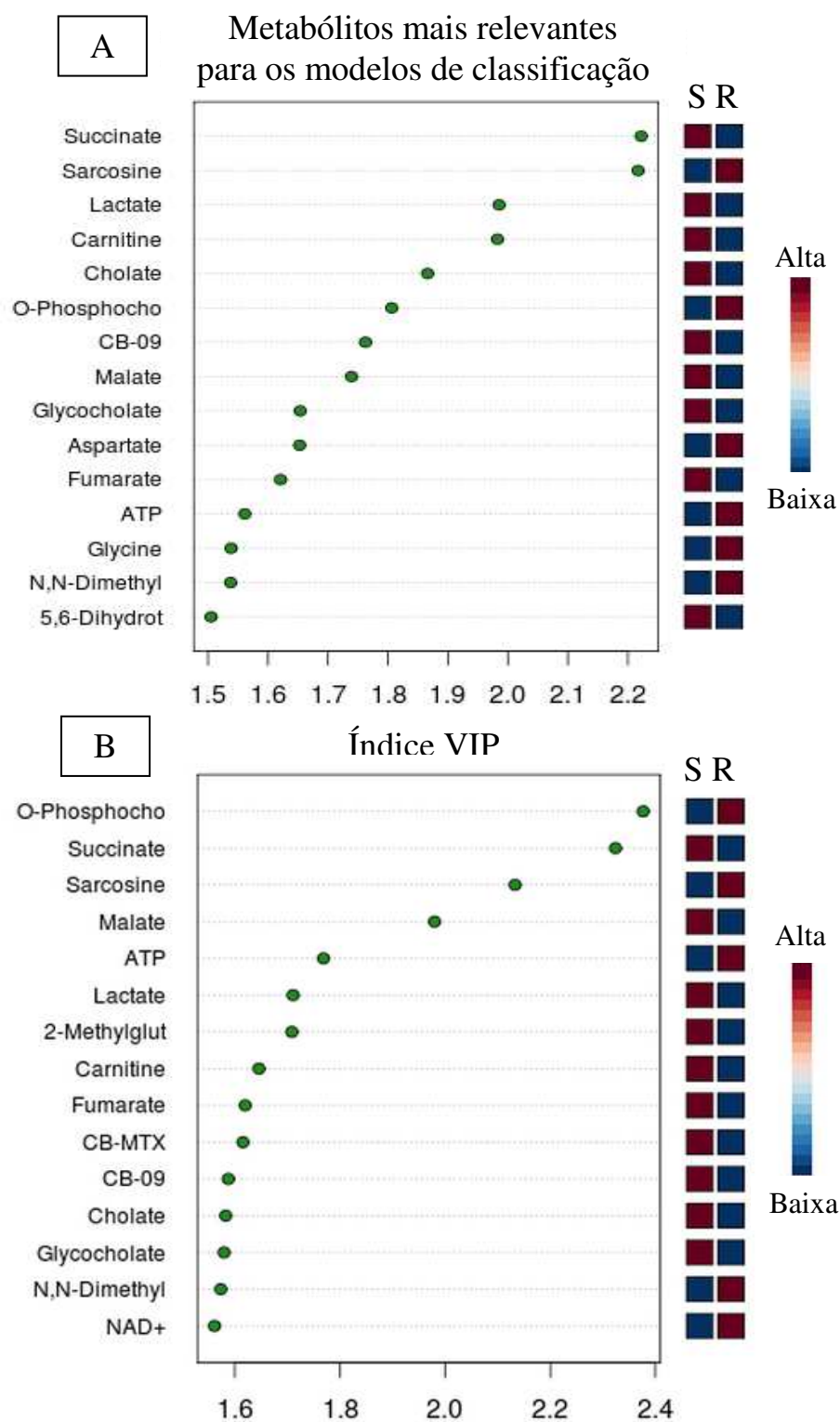
O teste de permutação para averiguação da robustez dos modelos foi feito na própria plataforma online MetaboAnalyst. Foram feitas 1.000 permutações do tipo “*B/W-ratio*”, com LOUCV (“*leave one out cross validation*”). Ambos os modelos apresentaram um valor de  $p < 0.005$ . Com relação às variáveis, os 15 metabólitos mais relevantes na construção de cada modelo (que apresentaram os maiores índices VIP) estão na Figura 11. Mapas de calor entre as amostras e das 10 variáveis com maiores índices VIP de cada modelo estão nas Figuras 12 (controles) e 13 (tratadas com MTX).



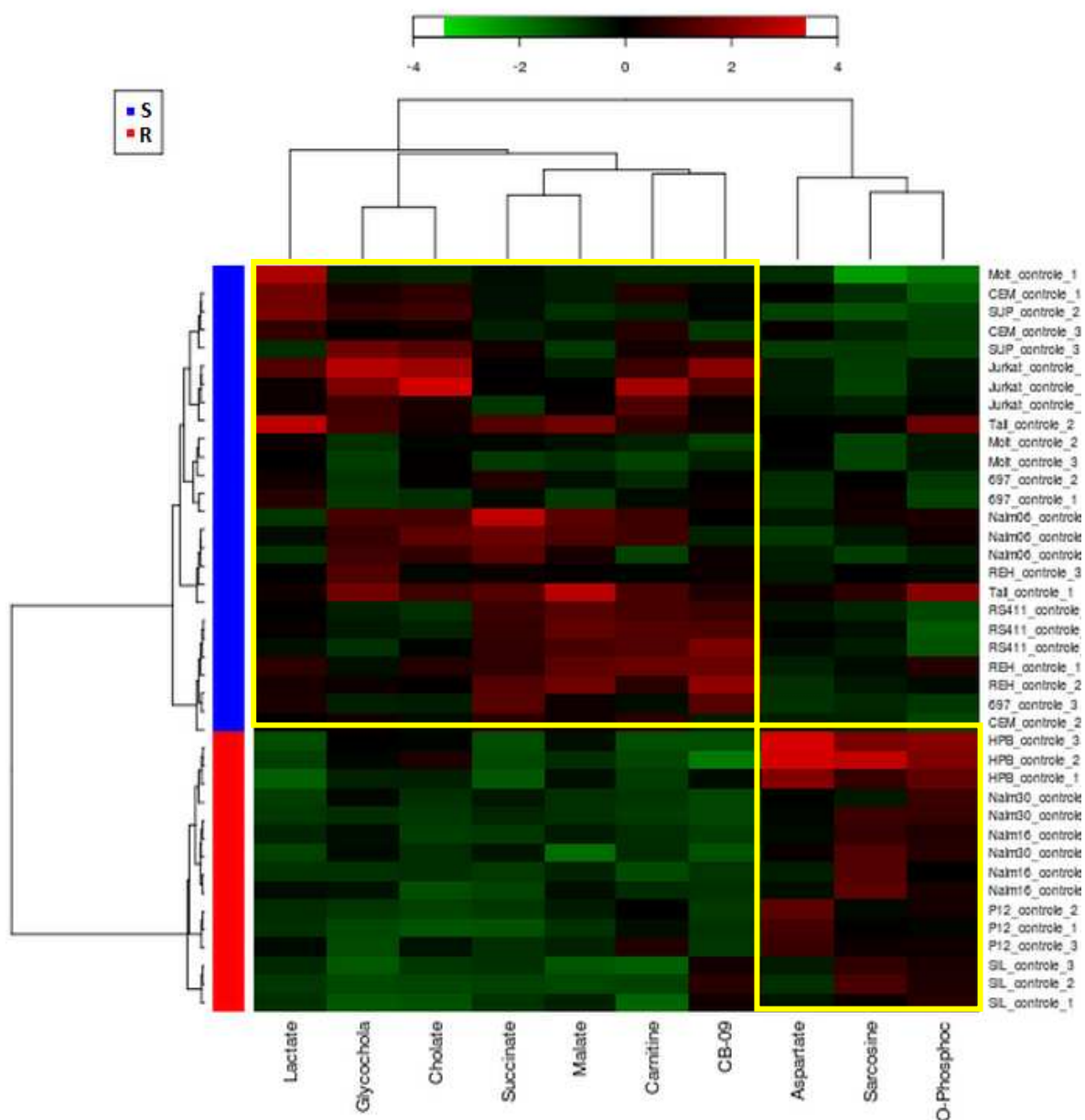
**Figura 09.** Representação bi e tridimensional da análise de PLS-DA para amostras controles. No gráfico bidimensional (superior), as elipses representam os intervalos de confiança de 95% para a característica de resistência ou sensibilidade.



**Figura 10.** Representação bi e tridimensional da análise de PLS-DA para amostras tratadas com MTX. No gráfico bidimensional (superior), as elipses representam os intervalos de confiança de 95% para a característica de resistência ou sensibilidade.

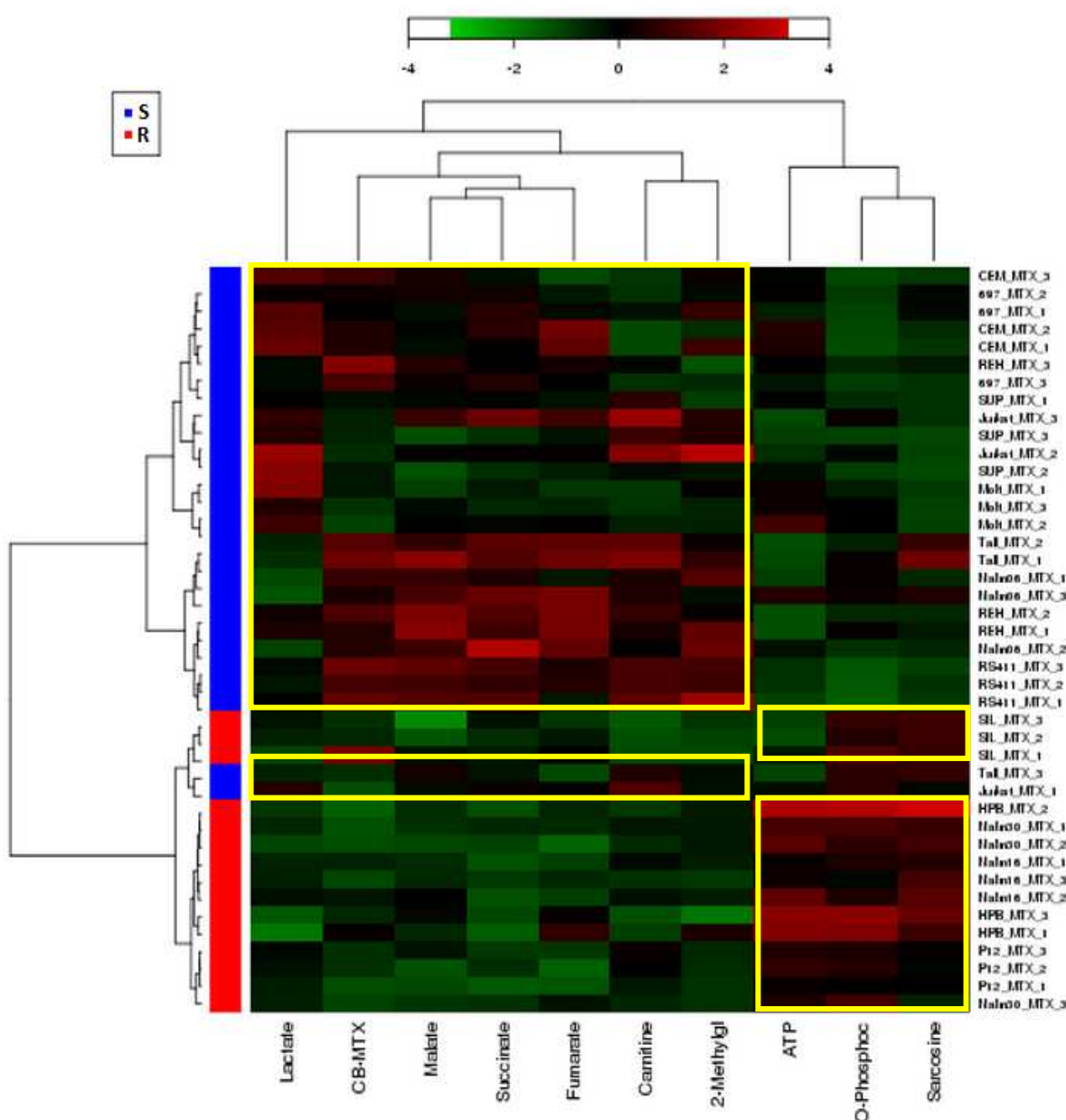


**Figura 11.** Relação dos 15 metabólitos com maiores índices VIP, obtidos na construção de modelo PLS-DA para amostras controles (A) ou tratadas com MTX (B). À direita, a associação de cada metabólito com a característica de resistência (R) ou sensibilidade (S).



**Figura 12.** Mapa de calor para os 10 metabólitos mais relevantes na geração do modelo de classificação para amostras controles, segundo a plataforma MetaboAnalyst. No centro do mapa de calor, a cor vermelha está associada maiores concentrações, e a cor verde, a menores. À esquerda do mapa está o cladograma de classificação das amostras, mostrando em azul as amostras sensíveis e em vermelho, as resistentes. Os retângulos amarelos destacam a correspondência entre aspartato, sarcosina, fosfocolina e as células resistentes; assim como os sete demais metabólitos estão relacionados às células sensíveis ao MTX.





**Figura 13.** Mapa de calor para os 10 metabólitos mais relevantes na geração do modelo de classificação para amostras tratadas com MTX, segundo a plataforma MetaboAnalyst. No centro do mapa de calor, a cor vermelha está associada maiores concentrações, e a cor verde, a menores. À esquerda do mapa está o cladograma de classificação das amostras, mostrando em azul as amostras sensíveis e em vermelho, as resistentes. Os retângulos amarelos destacam a correspondência entre ATP, fosfocolina, sarcosina e as células resistentes; assim como os sete demais metabólitos estão relacionados às células sensíveis ao MTX.



#### 4.5 ANÁLISE ROC

Na construção de modelos PLS-DA, foram encontradas as principais variáveis que, em conjunto, mostraram-se determinantes para os modelos de classificação. No entanto, não se sabe com exatidão a capacidade de cada uma delas, isoladas ou em conjunto, de discriminar corretamente linhagens sensíveis de resistentes ao MTX. Igualmente é desconhecida a concentração de cada metabólito que deve ser considerada como limiar de corte para esta classificação.

Neste sentido, a análise ROC (característica operativa do receptor – “*receiver operating characteristic*”) mostrou-se uma ferramenta muito útil na determinação de uma variável classificatória como um eficiente ou ineficiente discriminante de classes. Esta análise permitiu que fossem visualizados graficamente os parâmetros de sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico em diversos limiares de corte para uma variável em questão. O limiar de corte (“*cut-off*”) ideal foi aquele no qual o balanço dos parâmetros mencionados foi máximo.

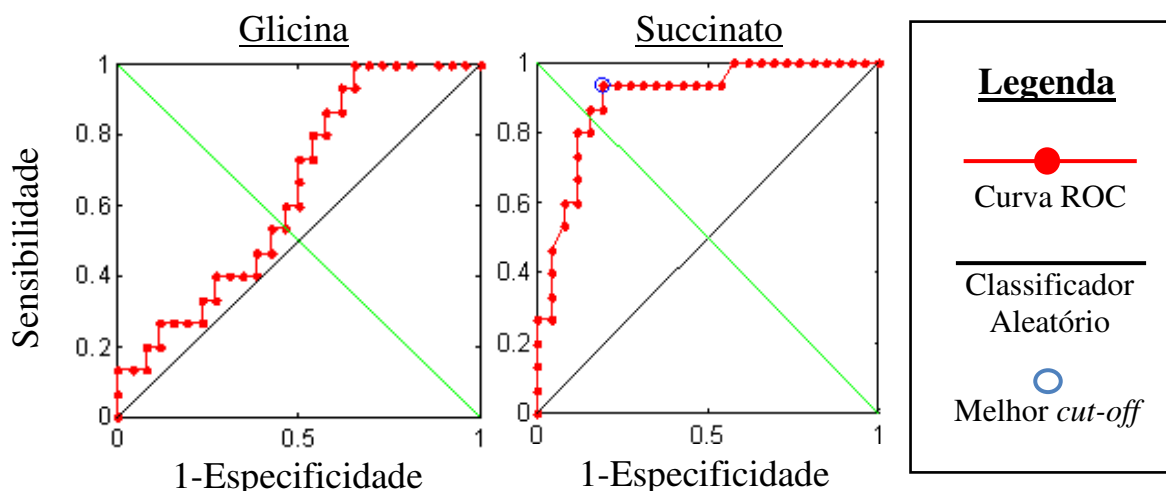
Usualmente, é classificada como “perfeita” a curva ROC com  $AUC=1$ ; “excelente” aquela com  $0,9 \leq AUC < 1$ ; “boa” a que apresenta  $0,8 \leq AUC < 0,9$ ; “razoável” a que tem  $0,7 \leq AUC < 0,8$ ; e “ruim” aquela com  $AUC < 0,7$ , uma vez que sua área não é estatisticamente diferente daquela obtida por um teste ao acaso (com  $AUC=0,5$ ). Foram realizadas análises ROC individuais para os 15 metabólitos que apresentaram maiores índices VIP na construção dos dois modelos de classificação. A Tabela 04 traz os valores da área sob a curva (AUC) de cada análise ROC bem como sua respectiva classificação quanto ao seu desempenho. A Figura 14 ilustra exemplos de curvas ROC tidas como de excelente ou mau desempenho.

Na sequência, os metabólitos cujas análises ROC tiveram desempenho bom ou excelente ( $AUC > 0,8$ ) foram selecionados para novas análises em conjunto, feitas para todas as combinações possíveis (“agrupamentos”) de metabólitos. Nestas análises de “agrupamentos”, os valores reais de concentração de cada metabólito foram confrontados com o seu respectivo melhor *cut-off* individual, ganhando um valor dinâmico “0”, caso estivessem em menor concentração que o *cut-off* de metabólitos relacionados à resistência OU acima do *cut-off* de metabólitos relacionados à sensibilidade, e “1” para o oposto destes casos. O produto destes “valores dinâmicos” por seus respectivos *F-measure* foram

**Tabela 4.** Área sob a curva (AUC) e classificação do desempenho em análise ROC de metabólitos com maiores índices VIP na construção dos modelos de classificação.

|                   | Amostras Controles |            | Amostras Tratadas |            |
|-------------------|--------------------|------------|-------------------|------------|
| Metabólito        | AUC                | Desempenho | AUC               | Desempenho |
| 2-Metilglutarato  | –                  | –          | 0,765             | Razoável   |
| Aspartato         | 0,759              | Razoável   | –                 | –          |
| ATP               | 0,756              | Razoável   | 0,755             | Razoável   |
| Carnitina         | 0,847              | Bom        | 0,772             | Razoável   |
| CB-09             | 0,751              | Razoável   | 0,726             | Razoável   |
| CB-MTX            | –                  | –          | 0,824             | Bom        |
| Colato            | 0,875              | Bom        | 0,753             | Razoável   |
| 5,6-Dihidrotimina | 0,665              | Ruim       | –                 | –          |
| Dimetilglicina    | 0,693              | Ruim       | 0,726             | Razoável   |
| Fosfocolina       | 0,792              | Razoável   | 0,832             | Bom        |
| Fumarato          | 0,797              | Razoável   | 0,782             | Razoável   |
| Glicina           | 0,643              | Ruim       | –                 | –          |
| Glicocolato       | 0,811              | Bom        | 0,802             | Bom        |
| Lactato           | 0,777              | Razoável   | 0,706             | Razoável   |
| Malato            | 0,824              | Bom        | 0,795             | Razoável   |
| NAD+              | –                  | –          | 0,691             | Ruim       |
| Sarcosina         | 0,864              | Bom        | 0,844             | Bom        |
| Succinato         | 0,900              | Excelente  | 0,855             | Bom        |

somados para a obtenção de um índice final, próprio de cada amostra e apenas para aqueles metabólitos considerados. A multiplicação de um “valor dinâmico” pelo valor de *F-measure* foi uma estratégia para que a contribuição desigual de cada metabólito fosse levada em consideração na composição deste índice. Simulando uma situação na qual as



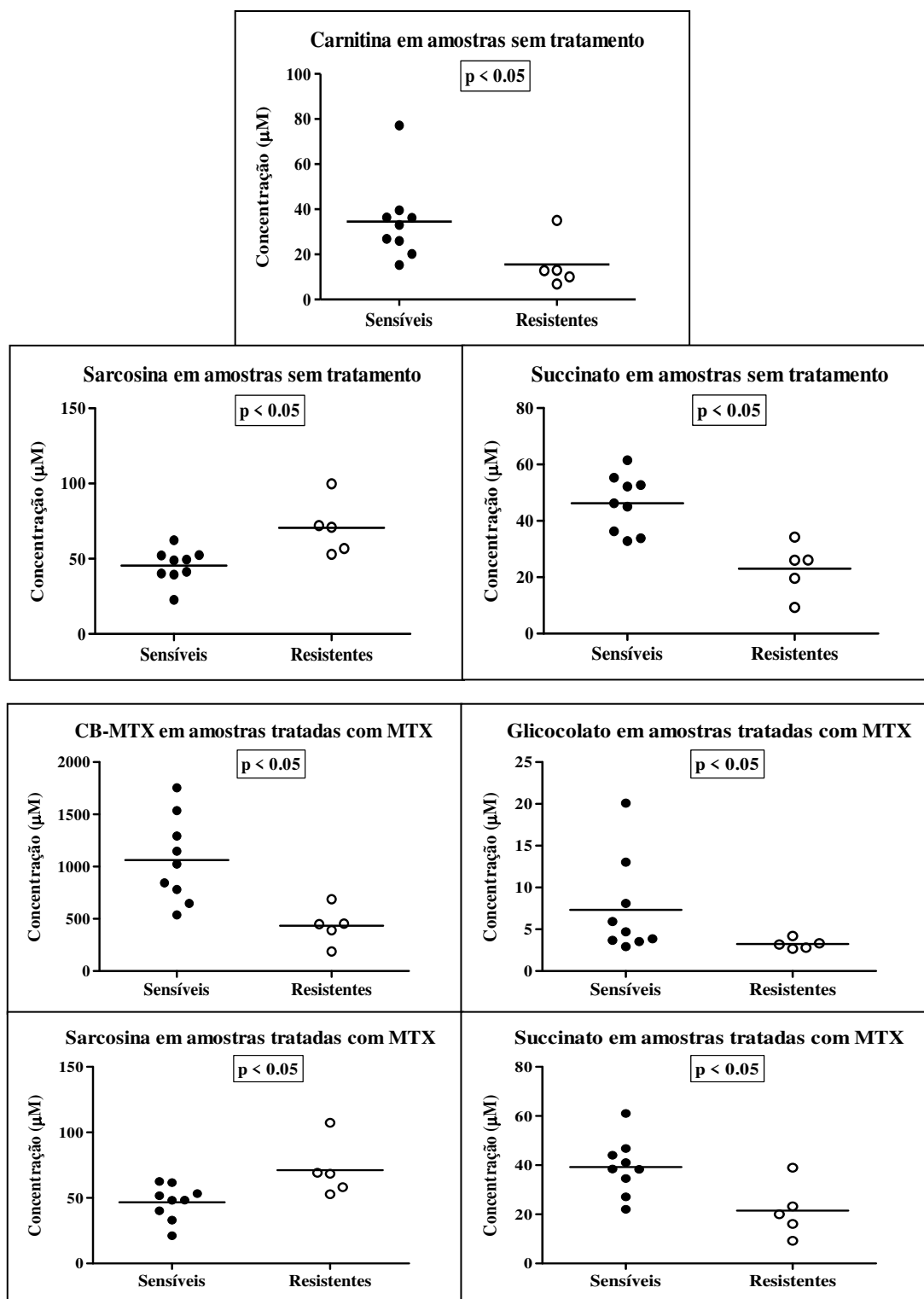
**Figura 14.** Exemplos de curvas ROC. À esquerda, exemplo de uma curva ROC com desempenho ruim ( $AUC=0,643$ ). À direita, uma curva ROC excelente ( $AUC=0,900$ ).

amostras (linhagens celulares) correspondiam a “pacientes” sensíveis ou resistentes ao MTX, os parâmetros de sensibilidade e especificidade (no melhor *cut-off* da análise ROC) foram calculados para cada agrupamento de metabólitos em amostras controles ou tratadas com MTX (APÊNDICE 3); a característica “resistência ao MTX” foi considerada aquela a ser detectada por este teste diagnóstico.

Foi observado que, em amostras controles, quatro combinações de metabólitos foram igualmente eficientes na classificação das amostras. Dentre estas, aquela com o menor número de metabólitos (apenas três: carnitina, sarcosina e succinato) foi capaz de classificar corretamente as 15 amostras resistentes (100% de sensibilidade) e 24 (dentre 26) amostras sensíveis (92,3% de especificidade).

Para amostras tratadas com MTX, o melhor teste diagnóstico, com quatro metabólitos (CB-MTX, glicocolato, sarcosina e succinato), identificou as 15 amostras resistentes (100% de sensibilidade), mas equivocou-se na classificação de quatro (dentre 27) amostras sensíveis (85,2% de especificidade). A Figura 15 traz os gráficos das concentrações destes metabólitos em amostras resistentes ou sensíveis ao MTX.

O teste feito em células não tratadas com MTX, mensurando seus níveis de carnitina, sarcosina e succinato, parece ser, portanto, o mais indicado na determinação da resistência ou sensibilidade ao quimioterápico.



**Figura 15.** Concentrações dos metabólitos que compõem os “testes diagnósticos” mais eficientes na detecção da resistência do MTX, em amostras controles (em cima) ou tratadas com o quimioterápico (embaixo). Os pontos representam as médias de cada linhagem.

É importante ressaltar que, em ambos os casos desta simulação, pacientes sensíveis ao MTX seriam classificados como resistentes ao quimioterápico. Este tipo de erro é denominado “erro de tipo I”, no qual são gerados “falso-positivos”. A consequência clínica deste erro seria que estes pacientes (7,7% dos pacientes sensíveis, de acordo com o primeiro teste) receberiam uma dosagem de MTX maior que a necessária para a remissão da doença. A superdosagem de MTX poderia expô-los ao inconveniente de efeitos colaterais mais intensos, ainda que a remissão da leucemia estivesse assegurada.

Com 100% de sensibilidade, estes testes não geraram “falso-negativos”; deste modo, todos os pacientes resistentes ao MTX seriam identificados e receberiam o tratamento adequado à sua condição. No caso deste teste em particular, um falso-negativo poderia ter consequências clínicas desastrosas: um paciente resistente classificado como sensível poderia receber uma dose de MTX aquém da necessária para a remissão da leucemia.

#### 4.6 BIOINDICADORES

Nas análises ROC individuais para os 15 metabólitos com maiores índices VIP, oito foram os metabólitos que apresentaram bom desempenho ( $AUC > 0,8$ ) na classificação das amostras de ao menos um dos dois modelos (controles ou tratados). Foram levantadas informações biológicas referentes a cada um destes compostos, visando uma compreensão bioquímica inicial das alterações associadas à resistência ou sensibilidade ao MTX. Todas as descrições a seguir (com exceção de CB-MTX) foram baseadas no banco de dados do Human Metabolome Database [91].

- Carnitina: nutriente da via de degradação da lisina, sintetizado pelo organismo em pequenas quantidades; desempenha importante função no metabolismo lipídico, transportando ácidos graxos de cadeia longa para o interior das mitocôndrias (com auxílio da enzima carnitina-palmitoil transferase). Na insuficiência de carnitina, os lipídeos não interiorizados nas mitocôndrias podem retornar à corrente sanguínea sob a forma de triglicerídeos.

- CB-MTX: composto desconhecido, não constou na biblioteca de metabólitos do software Chenomx. É caracterizado por um sinal duplete na região 8,07 ppm do espectro. Notadamente, está presente em células tratadas com MTX e ausente nas amostras não

tratadas com a droga (daí seu nome), o que sugere que este composto seja alguma forma metabolizada do quimioterápico.

- Colato: sal do ácido cólico, sintetizado a partir do colesterol, é um dos principais ácidos biliares em mamíferos. Facilita o transporte e absorção de lipídios e a excreção de colesterol.

- Fosfocolina: de função específica desconhecida, é a precursora da colina na via metabólica da glicina, serina e treonina e também participa da via metabólica dos glicerofosfolípides. A fosfocolina foi apontada como bioindicador prognóstico em câncer de mama [92].

- Glicocolato: sal do ácido glicocólico, é a versão do ácido cólico conjugado à glicina. Facilita o transporte e absorção de lipídios e a excreção de colesterol.

- Malato: intermediário do ciclo de Krebs, formado a partir de fumarato pela enzima fumarase (FH). Sua importância na produção de energia durante condições aeróbias (quando é oxidado a oxaloacetato) e anaeróbias (quando sua redução a succinato contribui para a remoção de agentes redutores que inibem a glicólise) está bem estabelecida.

- Sarcosina: é formada a partir da colina e do metabolismo da metionina e rapidamente degradada à glicina. Sarcosinemia pode resultar de deficiência severa de ácido fólico, uma vez que o folato é necessário para a conversão de sarcosina à glicina. Pesquisas recentes parecem apontar a sarcosina presente na urina como potencial biomarcador da progressão de câncer prostático [93].

- Succinato: intermediário do ciclo de Krebs, capaz de doar elétrons para a cadeia transportadora de elétrons. A enzima succinato desidrogenase (SDH), na membrana interna da mitocôndria, é a única enzima que participa do ciclo de Krebs e da cadeia transportadora de elétrons; catalisa a oxidação de succinato a fumarato e a redução acoplada de ubiquinona a ubiquinol. Mutações nos quatro genes que codificam as subunidades da SDH estão associadas a um amplo espectro de manifestações clínicas, como a coreia de Huntington. Acredita-se que a SDH (assim como a FH) desempenhe função como sensor celular de oxigênio e como supressor tumoral [94].

Dadas estas descrições, foi possível agrupar os metabólitos em três grandes vias bioquímicas e inferir seus estados de ativação em linhagens resistentes ou sensíveis:

1) Metabolismo energético aeróbio (Ciclo de Krebs): malato e succinato. Via superativada em linhagens sensíveis ao MTX.

2) Metabolismo de lipídeos: carnitina, colato e glicocolato. Via superativada em linhagens sensíveis ao MTX.

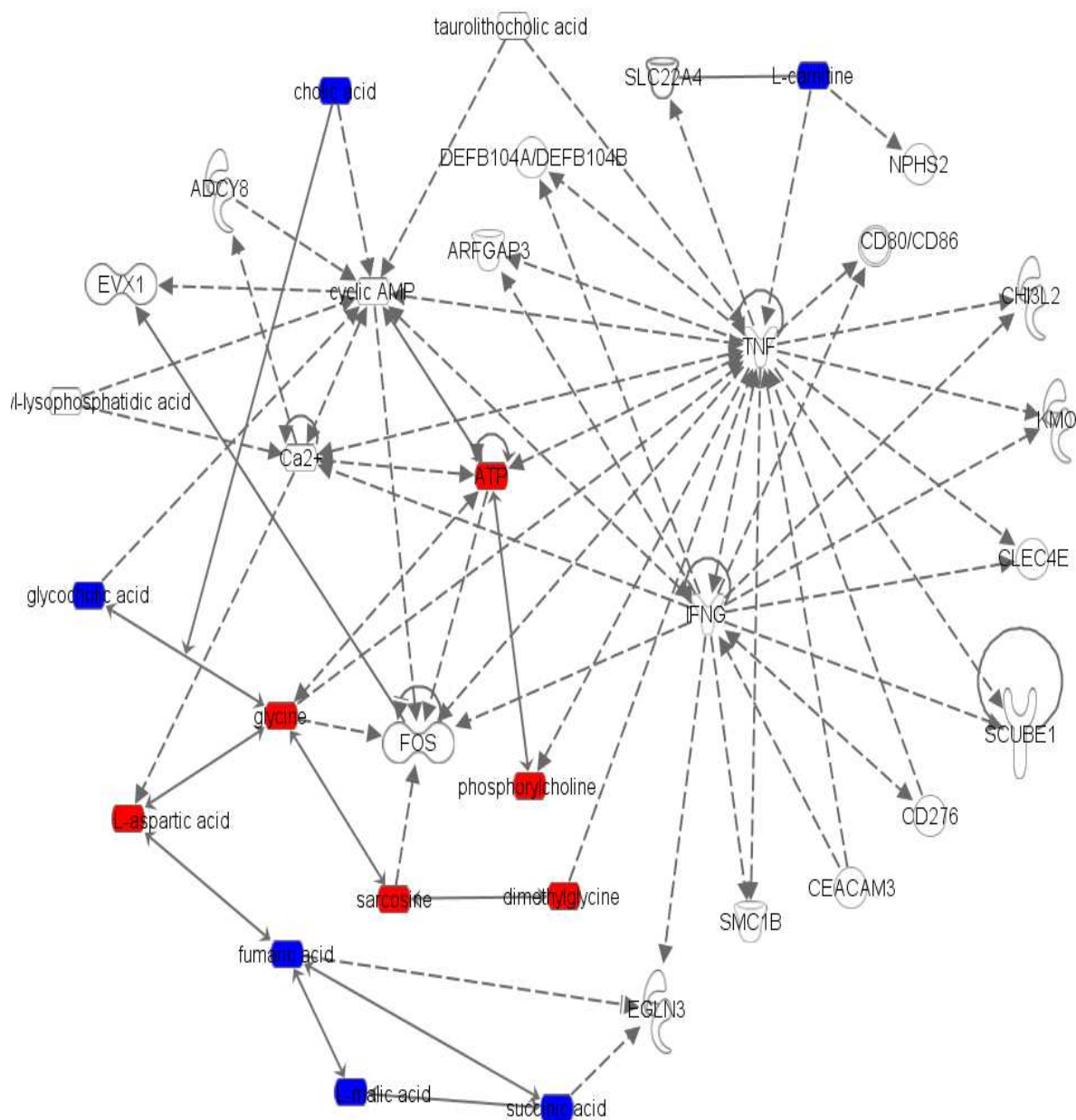
3) Metabolismo da glicina: fosfocolina e sarcosina. Via superativada em linhagens resistentes ao MTX.

O metabolismo da glicina, portanto, parece ser uma via-chave associada à característica de resistência das linhagens ao MTX, ao passo que linhagens sensíveis parecem ter um metabolismo lipídico e energético mais acelerado. Para se buscar compreender quais mecanismos bioquímicos estariam por detrás deste “interruptor metabólico”, foram construídos mapas de interação molecular.

#### 4.7 MAPAS DE “INTERAÇÃO”

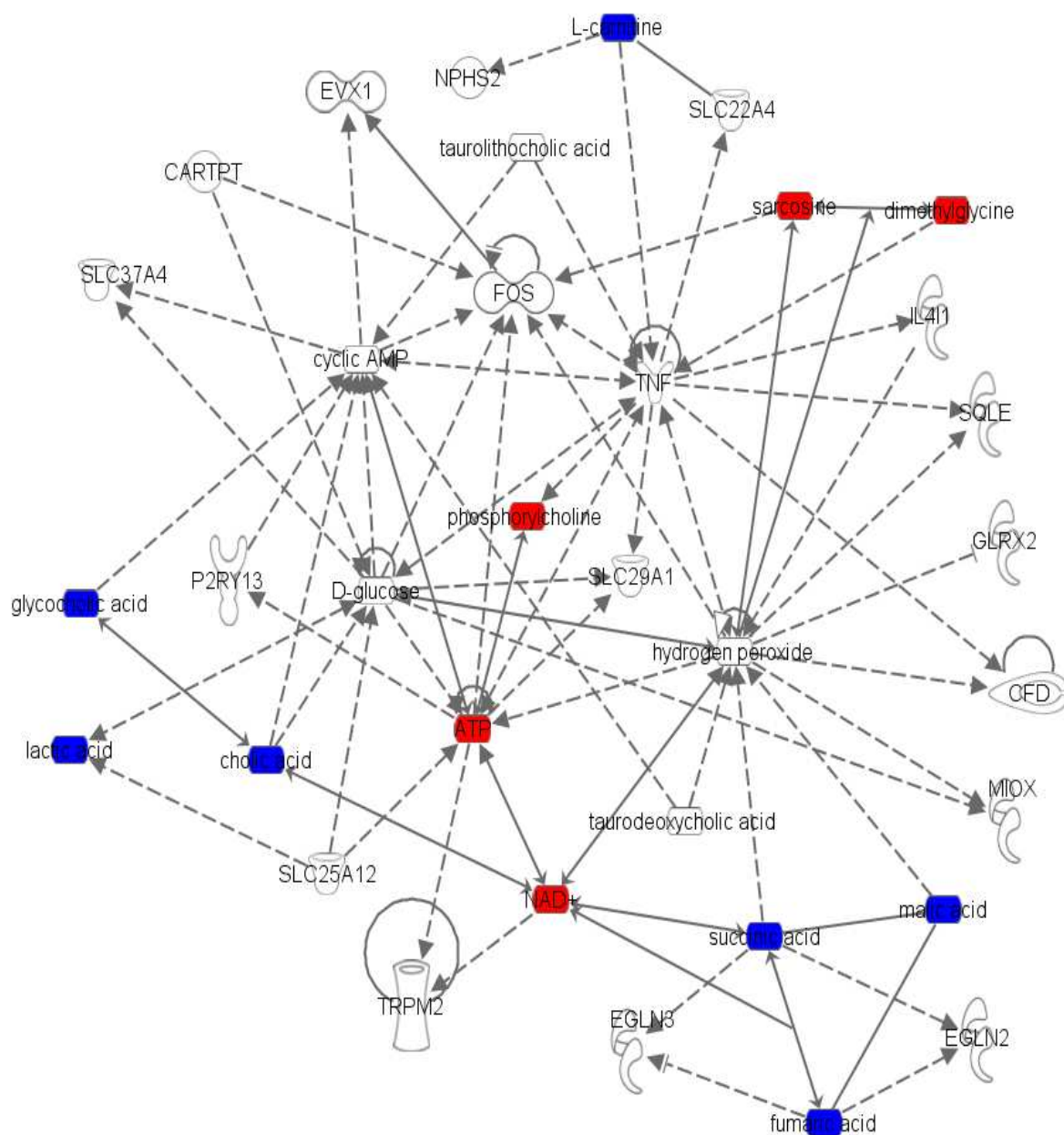
Com auxílio do software “Ingenuity Pathway Analysis” (Ingenuity Systems Inc., Redwood City, CA, EUA), nossos resultados metabolômicos foram integrados com dados de expressão gênica e proteômicos disponíveis na base de dados do programa. O Ingenuity é uma plataforma que permite, entre outras ferramentas, a construção de modelos (mapas) de interação entre diferentes níveis de organização biológica. Estes mapas de “interação” possibilitam uma melhor compreensão de resultados experimentais por meio da integração de vias bioquímicas e da revelação de potenciais alvos químicos e/ou candidatos a biomarcadores.

Foram construídos dois mapas de “interação” com os metabólitos com maiores índices VIP obtidos nos modelos PLS-DA para amostras controles e tratadas com MTX. Dentre os 15 metabólitos com maiores índices VIP para cada um dos modelos, um metabólito das amostras controles (CB-09) e três metabólitos das amostras tratadas (2-Metilglutarato, CB-09 e CB-MTX) tiveram de ser excluídos da análise por não constarem na base de dados do software. As Figuras 16 e 17 mostram os mapas de “interação” obtidos para amostras controles e tratadas, respectivamente.



**Figura 16.** Mapa de “interação” dos metabólitos relacionados à sensibilidade (azul) e resistência ao MTX (vermelho) em amostras controles. As setas contínuas entre dois metabólitos representam interações diretas (reações químicas catalisadas por uma enzima). As setas tracejadas representam relações indiretas entre genes, proteínas e metabólitos.





**Figura 17.** Mapa de “interação” dos metabólitos relacionados à sensibilidade (azul) e resistência ao MTX (vermelho) em amostras tratadas com o quimioterápico. As setas contínuas entre dois metabólitos representam interações diretas (reações químicas catalisadas por uma enzima). As setas tracejadas representam relações indiretas entre genes, proteínas e metabólitos.

Foi possível constatar que o AMP-cíclico, o fator de necrose tumoral (TNF), o interferon-gama (INFG ou INF- $\gamma$ ) e C-FOS (homólogo do oncogene de osteossarcoma viral murino FBJ) foram apontadas como moléculas centrais no mapa de “interação” molecular em amostras controles; já no mapa para amostras tratadas, AMP-cíclico, TNF, C-FOS, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e D-glicose parecem ocupar posições de maior destaque. A seguir, uma breve descrição destes genes, fatores de transcrição, moléculas sinalizadoras, metabólitos e suas relações com neoplasias, especialmente leucemias.

- O AMP-cíclico é um dos mais importantes mensageiros secundários celulares, formado a partir do ATP em uma reação catalisada pela adenilil ciclase, uma enzima associada com a face interna da membrana plasmática; executa uma série de alterações fisiológicas tais como ativação enzimática, alterações da permeabilidade da membrana celular, contrações de músculos lisos, ativação de síntese protéica e aumento na secreção celular. A desregulação do AMP-cíclico e a ativação aberrante das vias gênicas por ele influenciadas foram relacionadas com o crescimento de carcinoma hepatocelular [95], de ovário [96] e melanoma [97]. O fator de transcrição CREB (“*cAMP-response element-binding protein*”) foi inicialmente identificado como um mediador na transcrição de genes induzida pelo AMP-cíclico, sendo C-FOS um dos principais produtos em sua cascata de transcrição [98]. Em leucemia mielóide aguda, a superexpressão de CREB foi associada com aumento no risco de recaída e diminuição na sobrevida livre de eventos, sendo CREB classificado como um proto-oncogene. Em LLA pediátrica, foi demonstrado que quase 20% dos casos de recaída tinham mutações ou deleções em CREBBP (o gene que codifica a proteína CREB) [99]. Funcionalmente, as mutações prejudicaram a acetilação de histonas e a regulação da transcrição de alvos da CREB, inclusive genes responsivos a glicocorticóides [100].

- TNF é uma citocina envolvida na inflamação sistêmica, membro de um grupo de citocinas que estimulam a reação de fase aguda. Altas concentrações de TNF foram encontradas em pacientes com LLA quando comparados com controles [101]; além disso, expressões aberrantes de citocinas (dentre as quais TNF) foram associadas com LLA refratária [102]. Em um estudo realizado por Gu *et al.* [103] com duas linhagens celulares de LLA de mesmo imunofenótipo e propriedades moleculares similares (tais como o status

de p53 e expressão de MDM2 e Bcl-2) mas diferentes expressões de TNF, quando submetidas à radiação e à doxorubicina, apenas aquela com expressão de TNF se mostrou resistente à apoptose induzida por estes agentes físicos e químicos; sobrevivência celular e resistência à quimioterapia foram ambas atribuídas à ativação da via PI3K/Akt por ação do TNF. Curiosamente, pacientes com LLA pediátrica com altos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  exibiram alta contagem leucocitária no sangue periférico durante o diagnóstico, baixa porcentagem de blastos em fase S e reduzida taxa de apoptose em cultura quando comparados com pacientes com níveis de TNF abaixo da média [104].

- O INF- $\gamma$  é uma citocina crítica para a imunidade inata e adquirida; tem papel fundamental nas infecções virais e bacterianas. Sua expressão aberrante está associada com inflamações e várias doenças autoimunes. Em LLA pediátrica, polimorfismos no gene do INF- $\gamma$  foram associados com idade ao diagnóstico e com a classificação de grupos de risco (definido por resposta à prednisona, remissão citológica e doença residual mínima) em LLA B-derivada [105]. Foi demonstrado que pacientes com leucemia linfoblástica crônica apresentam níveis plasmáticos de INF- $\gamma$  bastante elevados quando comparados com controles [106]. Blastos leucêmicos que morriam rapidamente em meio de cultura tinham apoptose inibida quando tratados com INF- $\gamma$ ; ao inibir a apoptose, acredita-se que o INF- $\gamma$  contribui para o acúmulo clonal de linfoblastos na leucemia crônica [106].

- C-FOS é um proto-oncogene pertencente à família dos fatores de transcrição de genes de expressão rápida; sua transcrição é aumentada em resposta a fatores de crescimento e sua atividade e estabilidade são alteradas após fosforilação por MAPK, PKA, PKC ou CDC2. Membros da família FOS dimerizam com C-JUN para a formação do fator de transcrição AP-1, responsável pela transcrição de genes relacionados à proliferação e diferenciação celular e defesa imunológica. Foi confirmado que a AP-1 está entre os fatores de transcrição “despertados” pelo co-ativador de transcrição ASC-2, amplificado em neoplasias, o que sugere que C-FOS tenha relação com a cascata de transcrição alterada no câncer [107]. C-FOS já foi apontado como fator prognóstico em LLA infantil, sendo que crianças cujos blastos expressam C-FOS apresentam risco de recaída significativamente maior do que crianças com blastos C-FOS-negativos, o que sugere uma forte associação entre este oncogene e resistência a drogas [108].

- O peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio (ROS), tem um importante papel como molécula de sinalização em uma variedade de processos biológicos. No sistema imunológico, o  $H_2O_2$  liberado por células lesionadas parece exercer uma função quimiotática em linfócitos [109]. Também parece desempenhar papel relevante no processo de envelhecimento e no câncer: células cancerosas apresentam altas quantidades de  $H_2O_2$  que parecem estar associadas com alterações no DNA, proliferação celular, resistência à apoptose, metástase, angiogênese e a ativação de fatores induzidos por hipóxia (HIF-1); também foi observado que o fenótipo de malignidade de células cancerosas pode ser revertido apenas com a diminuição de concentrações celulares de  $H_2O_2$  [110]. Outra molécula categorizada como ROS, o óxido nítrico apresenta forte inibição de crescimento celular a linhagem T-derivada Jurkat, além de aumentar a expressão de Hsp70 e C-FOS. O silenciamento de Hsp70 potencializou a inibição provocada por óxido nítrico, mesmo em baixas concentrações. É de se esperar, portanto, que C-FOS (assim como Hsp70) teria um efeito anti-apoptótico protetor em células alvejadas por ROS, como subproduto de quimioterápicos [111]. Há uma extensa bibliografia de trabalhos que procuraram, a partir de drogas recém-sintetizadas, gerar ROS em células leucêmicas como uma tentativa de contornar resistência a drogas clinicamente difundidas.

- Com relação à D-glicose, ou apenas glicose, transformações malignas por vários oncogenes ou deleções de genes supressores tumorais resultaram em alterações qualitativas e quantitativas no metabolismo deste carboidrato [112, 113]. Genes envolvidos no metabolismo mitocondrial parecem também desempenhar funções semelhantes às de genes supressores de tumor [114]. Além disso, o microambiente tumoral provoca adaptações específicas no metabolismo celular que aumentam a tomada de substratos metabólicos, incluindo a glicose [115].

Estes genes, metabólitos e enzimas apontados pelos mapas de interação, somados aos metabólitos que foram identificados como biomarcadores da resistência/sensibilidade ao MTX por este trabalho, foram analisados conjuntamente, organizados em grandes grupos metabólicos. A seguir, estes grupos e algumas de suas relações com neoplasias.

#### 4.7.1 Metabolismo Energético

Observações e especulações interessantes acerca do metabolismo energético puderam ser depreendidas a partir dos mapas de “interação”. Uma delas, por exemplo, envolve os genes EGLN2 e EGLN3 e os fatores induzidos por hipóxia.

Os fatores induzidos por hipóxia (HIF-1), ativados pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e outros agentes oxidantes, são uma família de fatores de transcrição ativados quando a concentração de oxigênio diminui intracelularmente [116]. Uma das principais conseqüências da ativação de HIF-1 é a formação de novos vasos sanguíneos, que podem reverter a escassez local de oxigênio [116]. Ao contrário, em normóxia, a subunidade alfa da HIF-1 é hidroxilada por uma HIF proil-hidroxilase (cujas subunidades são codificadas pelos genes EGLN2 e EGLN3) que utiliza oxigênio como co-substrato, permitindo seu reconhecimento para ubiquitinação e rápida degradação por proteossomos [117].

A superexpressão de um transcrito antisenso natural da HIF-1alfa foi associada à agressividade tumoral em câncer de mama, estômago, cervical, endometrial, ovário e em carcinoma renal não papilar [118]. Há ainda evidência de que o TNF pode ativar indiretamente HIF-1 por meio da ação do fator nuclear kappa-beta ( $NF-\kappa\beta$ ), o qual também tem ganhado destaque nas pesquisas de novos fármacos [119]. Wellman *et al.* [120] demonstraram por imunohistoquímica que o componente da HIF-1alfa regulada por oxigênio está superexpresso em agrupamentos de células leucêmicas retiradas da medula óssea de crianças com LLA, e ausente em biópsias de medula óssea normal. Além disso, esta expressão diferencial da cascata de transcrição do HIF na medula óssea de pacientes com LLA foi associada com prognóstico, provavelmente devido ao seu papel na progressão da leucemia e na resposta à terapia.

Nas vias do metabolismo energético, além de succinato e malato, outro metabólito foi considerado marcador de sensibilidade ao MTX nos modelos PLS-DA construídos: o **lactato**. Produto da glicólise, o lactato já havia sido apontado por Otto Warburg como um composto característico do catabolismo tumoral, marcado pela glicólise acentuada mesmo na presença de oxigênio – fenômeno conhecido como “glicólise aeróbica” ou “efeito Warburg” [121].

A enzima lactato desidrogenase A (LDH-A, que por sinal é um gene alvo de HIF-1) converte piruvato + NADH em lactato +  $NAD^+$  e mostrou-se fundamental para a

tumorigênese em estudos que envolveram silenciamento ou deleção gênica. Como exemplo, foi observado que LDH-A era essencial em linfoma de Burkitt humano: uma pequena molécula inibidora de LDH-A desencadeou um estresse oxidativo severo em células cancerosas, semelhante ao estresse causado pelo silenciamento do gene mediado por RNAi, resultando em morte celular por necrose [122]. A redução da atividade de LDHA causa uma elevação da razão NADH/NAD<sup>+</sup>, inibindo a via glicolítica que demanda NAD<sup>+</sup> e estimulando inapropriadamente a atividade do complexo respiratório I, gerando grandes quantidades de ROS que resultariam na morte celular. Em LLA pediátrica, níveis plasmáticos de LDH foram associados com alta contagem leucocitária e baixa contagem plaquetária, apesar de que não relacionados com a percentagem de células em fase S na medula óssea. Além disso, pacientes com os maiores índices de LDH também foram os mais propensos a sofrer recaída, ao passo que menores índices de LDH foram quantificados no grupo de pacientes com maior sucesso terapêutico [123]. Estes dados indicaram que níveis plasmáticos de LDH podem ter um valor prognóstico em LLA pediátrica.

Os trabalhos que relacionam alterações do metabolismo energético e tumorigênese são crescentes, e outra enzima classicamente metabólica – a fumarato hidratase, FH, que converte fumarato a **malato** – também passou a ser vista como elo entre metabolismo e câncer (especificamente em mioma e carcinoma), ainda que não possa ser afirmado que a FH se comporte como um supressor tumoral [124-126].

#### 4.7.2 Ácidos Biliares

Tratam-se do **colato** e do **glicocolato**. Desde a década de 1930 acreditava-se que ácidos biliares eram promotores de neoplasias em células do epitélio gastrointestinal humano; entretanto, as últimas três décadas assistiram à “promoção” dos ácidos biliares a verdadeiros agentes carcinogênicos [127,128].

Foi demonstrado que ácidos biliares em geral têm a capacidade de danificar as membranas mitocondriais, o que permite que espécies reativas de oxigênio (ROS) extravasem para o citoplasma e terminem por causar grandes danos ao DNA nuclear, além de induzir vias de proliferação celular (i.e., atividade de NF- $\kappa$ B dependente de proteína quinase C) [129, 130].

Células de adenocarcinoma colorretal humano tornavam-se sensíveis a epirrubucina quando tratadas com glicocolato; substrato e droga, em conjunto, reduziram significativamente a expressão dos genes antiapoptóticos Bcl-2, MDR1 e das proteínas associadas ao MDR 1 e 2 (MRP1 e MRP2) – os três últimos relacionados com a resistência múltipla a drogas (MDR) – e aumentaram a expressão das pró-apoptóticas p53, Bax e caspase-9 e -3 [131]. De fato, o glicoquenodeoxicolato, outro sal biliar tal como o glicocolato, modula a formação de Mcl-1 (molécula antiapoptótica da família Bcl-2) em carcinomas hepatocelulares [132] e do já mencionado fator de transcrição AP-1 em hepatócitos, por meio do aumento da expressão das já associadas a neoplasias JUN-B e C-FOS [133].

Foi demonstrado que a proteína associada à resistência 3 (MRP3), membro da família de transportadores que conferem resistência contra vários quimioterápicos, catalisa o transporte tanto de glicocolato quanto de MTX – mas não MTXPG, o que significa que uma eficiente poliglutaminação do MTX é essencial para evitar seu efluxo da célula [134]. Além disso, polimorfismos em MRP3 estão associados com prognóstico em LLA infantil: portadores de um alelo específico apresentavam altas concentrações plasmáticas de MTX (portanto baixas concentrações intracelulares) e uma probabilidade quatro vezes maior de apresentar recaída com infiltração no sistema nervoso central [135].

Em outro estudo, a expressão de MRP2, MRP3, MRP4, MRP5 e SMRP foi avaliada em crianças com LLA sem tratamento prévio, sendo que apenas MRP3 mostrou-se significativamente associado com um prognóstico desfavorável, independentemente do imunofenótipo ou do sexo dos pacientes [136]. Altos níveis de MRP3 foram apontados como uma razão plausível para o pior prognóstico de meninos com relação a meninas e de pacientes com LLA-T sobre LLA-B – ambos com as mais altas médias de expressão de MRP3. Não é possível afirmar com nossos dados se uma maior interiorização de sais biliares por algumas células seja a causa ou a consequência de um fenótipo mais proliferativo e, portanto, de sua susceptibilidade à ação do MTX. Novos experimentos são necessários para averiguar se um tratamento com sais biliares interfere no grau de resistência das células ao MTX.

#### 4.7.3 Metabolismo de Aminoácidos

No caso do **aspartato**, um metabólito associado à resistência ao MTX, trata-se do substrato da enzima aspartato carbamoiltransferase (também conhecida como ATCase), responsável por catalisar a primeira reação direcionada à biossíntese das pirimidinas. A ATCase controla a biossíntese de pirimidinas ao ter alterada sua velocidade catalítica em resposta aos níveis celulares de purinas e pirimidinas. Produto final da via das pirimidinas, a citosina trifosfatada (CTP) reduz a velocidade catalítica da ATCase, ao passo que o ATP, produto final da via paralela das purinas, aumenta sua atividade [137]. Um inibidor de ATCase foi capaz de erradicar tumores sólidos em camundongos, mas leucemias murinas mostraram-se resistentes [138]. Não há registros se mutações em ATCase ou outras enzimas do metabolismo do aspartato causem resistência a drogas, mas parece plausível supor que tais mutações, caso existentes, poderiam ocasionar um acúmulo de aspartato intracelular devido a um desacoplamento na biossíntese de pirimidinas. A carência de nucleotídeos poderia desacelerar a divisão celular, tornando-a menos sensível à ação do MTX, o que poderia ser interpretado como resistência. O fato de concentrações significativas de aspartato terem sido encontradas em amostras resistentes não tratadas mas não nas mesmas amostras após tratamento com MTX aguarda elucidação: em teoria, uma falha na biossíntese de pirimidinas – a maior consequência da ação do MTX – provocaria o acúmulo tanto de timidilatos precursores de CTP quanto de aspartato.

Conforme mencionado, a **sarcosina** já foi apontada como metabólito marcador da progressão do câncer de próstata, e o que é mais surpreendente: a adição direta de sarcosina em células prostáticas benignas conferiu-lhes um fenótipo invasivo (maior motilidade) [139]. Experimentos com RNAi mostraram que a enzima glicina N-metil-transferase (GNMT) é a fonte primária de sarcosina celular, a partir de glicina, assim como a enzima dimetilglicina desidrogenase (DMGDH), a partir de dimetilglicina; já a enzima sarcosina desidrogenase (SARDH) converte sarcosina em glicina novamente, e tetrahydrofolato (THF) em 5,10-metileno tetrahydrofolato (5,10-CH<sub>2</sub>-THF). O mesmo trabalho apontou que o *knock-down* de SARDH aumentou os níveis intracelulares de sarcosina e a invasividade das células prostáticas. Tais resultados sugeriram que, mais do que um marcador, a sarcosina poderia estar envolvida diretamente na agressividade do câncer.



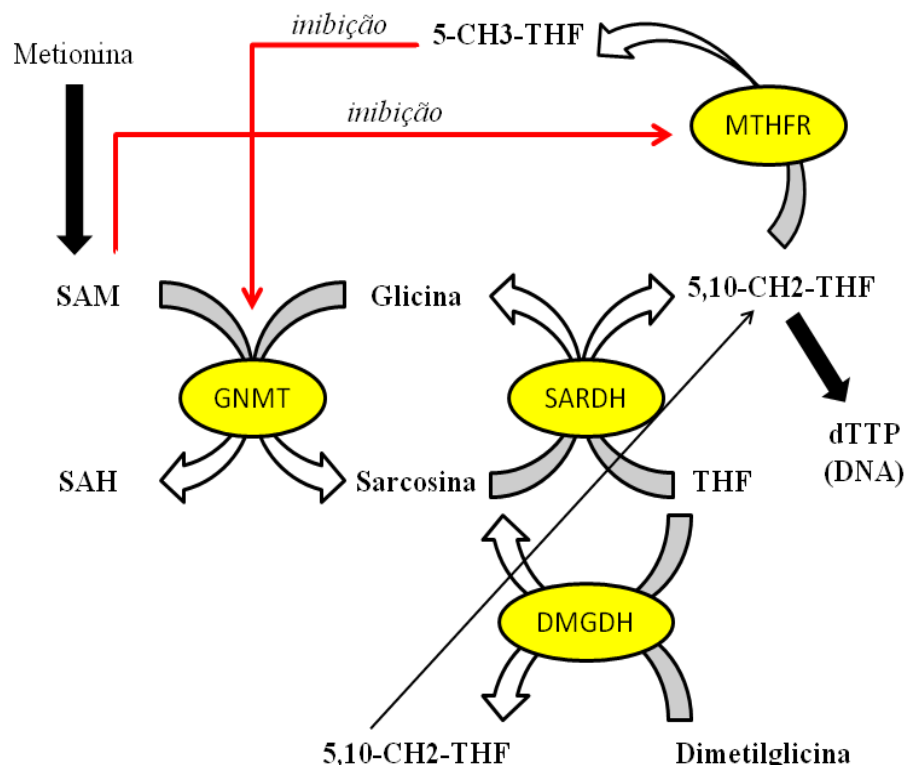
A Figura 18 mostra algumas conexões entre metabólitos e enzimas relacionadas à sarcosina. O metabolismo da metionina culmina na produção de S-Adenosilmetionina (SAM), reconhecidamente o doador primário de grupamentos “metil” na maioria das reações que envolvem as cerca de 50 enzimas metiltransferases para a formação de produtos fisiológicos importantes (metilação de DNA, RNA, histonas ou outras proteínas) [140].

Acredita-se que a enzima GNMT seja uma rota alternativa para a conversão de SAM a S-Adenosilhomocisteína (SAH). A função de GNMT seria remover o excesso de SAM sem perturbar o meio fisiológico. Interessante notar que o 5-metil tetrahidrofolato (5-CH<sub>3</sub>-THF) inibe GNMT, a qual consome SAM, ao passo que SAM inibe a enzima metileno-tetrahidrofolatoredutase (MTHFR), que produz 5-CH<sub>3</sub>-THF. A enzima MTHFR é justamente a enzima alvo do metotrexato, o qual compete com o ácido fólico, seu substrato natural.

Este complexo regula a disponibilidade de grupos “metil”, e a sarcosina está no centro desta regulação. Parece haver, portanto, uma íntima relação entre metabolismo de grupamentos metil e metabolismo do ácido fólico, uma vez que coenzimas do metabolismo do folato são carregadoras de unidades compostas por um carbono [140].

Nos mapas de “interação”, a relação indireta que há entre sarcosina e C-FOS, apontado pelo software Ingenuity, foi baseada num trabalho em neurologia, na qual a sarcosina reverteu a expressão de C-FOS induzida por cetamina no bulbo olfativo de ratos, apontando para um potencial anti-psicótico deste metabólito [141]. Em neoplasias, a sarcosina foi recentemente apontada como responsável pelo aumento da expressão gênica do receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (a oncoproteína HER2/neu) [142].

Há cada vez mais evidência de que esta proteína está envolvida na progressão do câncer de próstata; desta forma, ficaria estabelecido que concentrações elevadas de sarcosina poderiam induzir o surgimento de neoplasia prostática. Não há registro de que alterações de expressão de C-FOS (ou de outros fatores de transcrição) provocados por diferentes concentrações de sarcosina em leucemia tenham sido investigadas, tampouco se a supressão de sarcosina em linhagens leucêmicas resistentes ao MTX seria capaz de torná-las sensíveis ao quimioterápico.



**Figura 18.** Diagrama de conexões entre metabólitos e enzimas relacionadas à sarcosina. É possível observar uma estreita relação entre metabolismo de grupamentos metil (metionina, SAM e SAH) e metabolismo do ácido fólico (THF, 5,10-CH<sub>2</sub>-THF e 5-CH<sub>3</sub>-THF), com inibição cruzada da enzima MTHFR por SAM e da enzima GNMT por 5-CH<sub>3</sub>-THF. GNMT = glicina N-metil-transferase; SARDH = sarcosina desidrogenase; DMGDH = dimetilglicina desidrogenase; MTHFR = metileno-tetrahidrofolatoredutase; SAM = S-Adenosilmetionina; SAH = S-Adenosilhomocisteína; THF = tetrahidrofolato.

Outro bioindicador de sensibilidade, a **carnitina** é uma amônia quaternária, derivada da lisina e da metionina, presente nas mitocôndrias de todos os tecidos musculares de mamíferos. Por meio da enzima carnitina-acilcarnitina translocase, a carnitina transporta ácidos graxos de cadeia longa para o interior da mitocôndria, onde serão degradados a acetil-CoA via beta-oxidação para a geração de energia no ciclo do ácido cítrico [143]. Estudos associaram suplementação nutricional com carnitina com atenuação de efeitos colaterais da diabetes [144], da ingestão de etanol [145] e de quimioterápicos [146], inclusive o metotrexato [147]. Todos estes trabalhos apontam para um efeito antioxidante da carnitina. De fato, a carnitina foi capaz de proteger órgãos internos (mucosa intestinal, parênquima hepático e epitélio glomerular e tubular renal) de danos oxidativos mais

severos causados pela infusão de MTX em ratos, além de inibir a apoptose de leucócitos saudáveis e a concentração de TNF- $\alpha$  plasmático [147]. A grande vantagem é que a proteção contra os efeitos colaterais pela carnitina parece não interferir na eficácia dos agentes quimioterápicos [148].

Dentro da célula, os ácidos graxos têm duas principais vias a seguir: 1) beta-oxidação na mitocôndria para produção de energia ou 2) conversão citosólica em triacilglicerol ou fosfolípides para vias de biossíntese. Na mitocôndria, quando o ciclo do ácido cítrico está em plena atividade devido à abundância de carboidratos, o citrato é transportado para o citoplasma onde é quebrado em acetil-CoA e oxaloacetato pela ATP citrato liase. Malonil-CoA, formado pela carboxilação de acetil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase, é utilizado na biossíntese de ácidos graxos; este composto inibe a etapa limitante da beta-oxidação de ácidos graxos ao impedir que estes últimos se associem à carnitina, deixando de entrar na mitocôndria para sofrer oxidação [137]. Sabe-se que altas concentrações de NADH e acetil-CoA inibem a beta-oxidação, uma vez que sinalizam que carboidratos já estão sendo utilizados para a produção de ATP [137]. No entanto, não é possível saber se o excesso de carnitina encontrado em células sensíveis ao MTX seja consequência de uma diminuição do transporte de ácidos graxos para sofrer beta-oxidação (causada por um excesso de carboidratos e, portanto, de malonil-CoA) ou trata-se do resultado de mecanismos concernentes à tomada/eliminação da própria carnitina, característicos de linhagens sensíveis ao MTX. Caso a carnitina estivesse associada a ácidos graxos de cadeia longa, é plausível supor que o conjugado carnitina-ácido graxo ficasse diluído na fase apolar (que é descartada) durante a extração com metanol e clorofórmio. Se isto realmente estiver acontecendo, a baixa concentração de carnitina nas linhagens resistentes poderia ser atribuída a este artefato metodológico.

Foi demonstrado que o transportador humano de carnitina, hCT2, (codificado pelo gene SLC22A16) é o responsável pela interiorização celular da bleomicina, antineoplásico empregado no tratamento de linfoma e carcinomas [149]. A investigação da expressão gênica deste transportador de carnitina nas diferentes linhagens leucêmicas estudadas neste trabalho poderia justificar as concentrações diferenciais encontradas para a carnitina, assim como especular o emprego da bleomicina em leucemias que apresentem expressão elevada do gene SLC22A16.

#### 4.7.4 Metabolismo de Fosfolípidos

Produto da fosforilação da colina pela enzima colina quinase (ChoK ou CK), a **fosfocolina** é um substrato da via de Kennedy (via de biossíntese dos fosfolípidos), precursora de fosfatidilcolina – principal fosfolípide nas membranas de eucariotos [150]. A superexpressão da isoforma CK $\alpha$ -1 tem sido associada com câncer: carcinomas colorretais, pulmonares e prostáticos apresentam maior expressão desta enzima do que tecidos não cancerosos [151].

Recentemente, foi descoberto que a colina quinase CK $\alpha$ -1 tem a capacidade de se ligar ao receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) dependente da superexpressão do proto-oncogene tirosina-proteína quinase (c-Src) [152]. EGFR é um oncogene cuja autofosforilação resulta nas cascatas de ativação das vias de MAPK/ERK, AKT e C-JUN N-terminal quinases, o que culmina na síntese de DNA e modula fenótipos de migração, adesão e proliferação celular [153]. Mutações que levam à superexpressão ou superatividade de EGFR já foram associadas a câncer de pulmão [154], anal [155] e glioblastoma multiforme [156], sendo que esta enzima já é alvo de fármacos quimioterápicos, tais como gefitinib e erlotinib para câncer de pulmão [157] e cetuximab para câncer de cabeça e pescoço e colorretal metastático [158]. c-Src é um proto-oncogene que desempenha função na regulação da proliferação celular, sendo que mutações neste gene poderiam estar envolvidas na progressão da malignidade de várias neoplasias [159]. Seu potencial em inibir a proteína fundida BCR-ABL fez com que a União Européia aprovasse o uso do Dasatinib (um inibidor de c-Src) em pacientes com leucemia mielóide crônica resistentes a imatinib e com leucemia linfóide aguda positiva para cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) [160]. De fato, c-Src foi apontado como necessário na indução de leucemia linfoblástica aguda B-derivada, mas não na indução de leucemia mielóide crônica, em pacientes que apresentavam cromossomo Filadélfia [161].

O acúmulo de fosfocolina, consequência da superexpressão de CK, aumenta a malignidade de linhagens de câncer de mama [162]. Uma explicação para este fenômeno veio com a descoberta de que CK $\alpha$ -1 tem a capacidade de fosforilar (e, portanto, regular) a proteína quinase B (AKT/PKB), classicamente associada à invasividade, sobrevivência e proliferação de células tumorais, sendo uma das mais frequentes alterações observadas em neoplasias [163]. Dentre outras ações, AKT/PBK pode ativar NF- $\kappa$ B (pró-sobrevivência)

[164], dissociar o gene promotor de apoptose associado à Bcl-2 (BAD) do complexo Bcl-2/Bcl-X, fazendo-o perder sua função pró-apoptótica [165], aumentar o número de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) que se dirigem para a membrana plasmática [166] e estimular a angiogênese [167].

Entretanto, AKT/PKB também promove a superação das fases de parada G1 [168] e G2 [169] do ciclo celular. Este maior ritmo de ciclagem estaria de acordo com o aumento de produção de fosfocolina na via bioquímica de Kennedy, mas parece incongruente com a resistência ao MTX observada justamente nas linhagens celulares que apresentaram as mais altas concentrações de fosfocolina; em outras palavras, as linhagens com maior teor de fosfocolina seriam, teoricamente, aquelas com maior taxa de divisão celular e que apresentariam, portanto, maior sensibilidade ao MTX. Este aparente paradoxo permanece.

#### **4.7.5 Algumas Observações**

A maioria dos metabólitos que apresentaram considerável relevância estatística para os modelos de classificação foi comum para amostras controles ou tratadas com MTX. Este dado pode ser interpretado como um resultado por si só: o reduzido número de biomarcadores e a proximidade dos mapas de “interação” evidenciam que o tratamento com MTX não é capaz de provocar distúrbios metabólicos amplos nas células – ao menos não no nível em que este foi estudado. Ao contrário, alterações metabólicas pontuais parecem ser a consequência da ação da droga.

Em nossa tentativa de contar uma “história biológica” seguindo as pistas dos distúrbios metabólicos aferidos, poucas foram as ocasiões em que foi possível correlacionar diretamente alterações metabólicas com o metabolismo do ácido fólico e, portanto, com mecanismo de ação do MTX. As exceções foram, por exemplo, o aspartato e a glicina, cuja presença ou ausência foi discutida diretamente em relação ao tratamento com o quimioterápico. Para os demais metabólitos, pouco mais que um levantamento bibliográfico – além de especulações acerca de sua relação com leucemia linfóide aguda – pôde ser feito. Novos estudos deverão investigar o papel que alguns destes metabólitos possam ter na aquisição e/ou manutenção da resistência ou sensibilidade à ação do MTX.

## 5 – CONCLUSÕES

1) Foi possível classificar as linhagens B- e T-derivadas em resistentes (5 linhagens) e sensíveis (9 linhagens) ao MTX pelo método de redução do MTT.

2) As condições de cultura celular nas quais as diferenças metabólicas entre linhagens resistentes e sensíveis foram máximas, foram encontradas intracelularmente, após 24h de tratamento com 25 nM de MTX.

3) Oitenta e quatro metabólitos foram considerados na análise metabolômica, dos quais 72 foram identificados pelo software Chenomx.

4) Os modelos de PCA não exibiram uma segregação satisfatória das linhagens quanto à sua resistência/sensibilidade ao MTX; já os modelos de PLS-DA para amostras controles e tratadas conseguiram esta segregação.

5) Oito metabólitos apresentaram bom desempenho ( $AUC > 0,8$ ) individual nas análises ROC de classificação das amostras de ao menos um dos dois modelos (controles ou tratados). Estes metabólitos podem ser considerados bioindicadores de sensibilidade (carnitina, CB-MTX, colato, glicocolato, malato e succinato) ou de resistência (fosfocolina e sarcosina).

6) O teste diagnóstico composto por carnitina, sarcosina e succinato mostrou-se eficaz na classificação de linhagens controles, com 100% de sensibilidade para a característica “resistência ao MTX” e 92,3% de especificidade (24 acertos dentre 26); em amostras tratadas, o melhor teste diagnóstico foi composto por CB-MTX, glicocolato, sarcosina e succinato, apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 85,2% (23 acertos dentre 27).

7) Mapas de integração bioquímica mostraram relações entre metabólitos, citocinas, fatores de transcrição e genes; e evidenciaram possíveis vias alteradas em linhagens resistentes ou sensíveis ao MTX. Simulando uma investigação clínica com amostras de pacientes, foram feitas especulações sobre alvos ou intervenções terapêuticas que poderiam ocasionar a perda da resistência ao quimioterápico.

## 6 – PERSPECTIVAS

A análise metabolômica da resistência ao metotrexato em linhagens leucêmicas mostrou-se uma poderosa e promissora ferramenta de investigação clínica. O acesso à composição metabólica intracelular das linhagens por meio de ressonância magnética nuclear, a quimiometria, os testes diagnósticos e a integração bioquímica dos dados revelaram interações gênicas, enzimáticas e metabólicas que podem estar diferencialmente alteradas em linhagens sensíveis ou resistentes ao MTX; bem como permitiram a especulação sobre possíveis estratégias e alvos moleculares que poderiam tornar sensíveis células resistentes ao quimioterápico.

Ainda que novos testes devam ser feitos em blastos de pacientes, este estudo preliminar permite vislumbrar o prenúncio de um futuro clínico no qual pacientes de leucemia sejam tratados de maneira mais individualizada, sendo alocados em diferentes grupos de tratamento que, além dos critérios já vigentes em sua estratificação, levem em consideração a resistência destes pacientes *a priori* de sua medicação com quimioterápicos.

Uma práxis clínica com este cuidado poderia tornar o tratamento da leucemia mais eficiente ao reduzir: tempo e gastos clínicos, desperdiçados em terapias inadequadas; sofrimentos de pacientes, por efeitos colaterais possivelmente evitáveis; e óbitos provocados por intoxicação por terapias inapropriadas e, por isso, ineficazes. Não obstante, a possibilidade de integração de dados metabolômicos e genéticos, numa abordagem própria à Biologia de Sistemas, pode, indiretamente, vir a revolucionar o tratamento da leucemia – e de tantas outras doenças – por meio da averiguação de sub/superativação diferencial de vias bioquímicas em diferentes subtipos da neoplasia.

É bastante plausível supor que nesta interface fisiológica entre genes e metabólitos estejam as chaves da descoberta de tantas moléculas que, talvez por falta de evidências exclusivamente genéticas, foram até o presente ignoradas como marcadoras de condições clínicas e/ou potenciais alvos terapêuticos.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippé J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 295-309.
- [2] Borst P. Genetic mechanisms of drug resistance: a review. *Acta Oncol*. 1991; 30(1): 87-105.
- [3] Kruh GD. Introduction to resistance to anticancer agents. *Oncogene*. 2003; 22(47): 7262-4.
- [4] Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Ludviksson BR, Valdimarsson H. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol*. 2005; 114(2): 154-63.
- [5] Galpin AJ, Schuetz JD, Masson E, Yanishevski Y, Synold TW, Barredo JC, *et al*. Differences in Folylpolylglutamate Synthetase and Dihydrofolate Reductase Expression in Human B-Lineage versus T-Lineage Leukemic Lymphoblasts: Mechanisms for Lineage Differences in Methotrexate Polyglutamylation and Cytotoxicity. *Mol Pharmacol*. 1997; 52(1): 155-63.
- [6] Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, *et al*. Polyglutamation of methotrexate: is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest*. 1985; 76(3): 907-12.
- [7] Shane BL. The role of folylpolyglutamate synthase in the regulation of folate and one-carbon metabolism. *Vitam Horm*. 1989; 46: 263.
- [8] Jolivet J, Schilsky RL, Bailey BD, Drake JC, Chabner BA. Synthesis, retention, and biological activity of methotrexate polyglutamates in cultured human breast cancer cells. *J Clin Invest*. 1982; 70(2): 351-60.
- [9] Fry DW, Yalowich JC, Goldman ID. Rapid formation of poly-gglutamyl derivatives of methotrexate and their association with dihydrofolate reductase as assessed by high-pressure liquid chromatography in Ehrlich ascites tumor cell in vitro. *J Biol Chem*. 1982; 257(4): 1890-6.
- [10] Allegra CJ, Drake JC, Jolivet J, Chabner BA. Inhibition of phosphoribosylamino-imidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(15): 4881-5.
- [11] Li WW, Lin JT, Tong WP, Trippett TM, Brennan MF, Bertino JR. Mechanisms of natural resistance to antifolates in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res*. 1992; 52(6): 1434-8.
- [12] Fabre I, Fabre G, Goldman ID. Polyglutamylation, an important element in methotrexate cytotoxicity and selectivity in tumor versus murine granulocytic progenitor cells in vitro. *Cancer Res*. 1984; 44(8): 3190-5.
- [13] Schuetz JD, Westin EH, Matherly LH, Pincus R, Swerdlow PS, Goldman ID. Membrane protein changes in an L1210 leukemia cell line with a translocation defect in the methotrexate-tetrahydrofolate cofactor transport courier. *J Biol Chem*. 1989; 264(27): 16261-7.
- [14] Matherly LH, Taub JW, Ravindranath Y, Proefke SA, Wong SC, Gimotty P, *et al*. Elevated dihydrofolate reductase and impaired methotrexate transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995; 85(2): 500-9.
- [15] Srimatkandada S, Schweitzer BI, Moroson BA, Dube S, Bertino JR. Amplification of a polymorphic dihydrofolate reductase gene expressing an enzyme with decreased binding to methotrexate in a human colon carcinoma cell line, HCT-8R4, resistant to this drug. *J Biol Chem*. 1989; 264(6): 3524-8.
- [16] Wang Y, Dias JA, Nimec Z, Rotundo R, O'Connor BM, Freisheim J, *et al*. The properties and function of gamma-glutamyl hydrolase and poly-gamma-glutamate. *Adv Enzyme Regul*. 1993; 33: 207-18.
- [17] Göker E, Lin JT, Trippett T, Elisseyeff Y, Tong WP, Niedzwiecki D, *et al*. Decreased polyglutamylation of methotrexate in acute lymphoblastic leukemia blasts in adults compared to children with this disease. *Leukemia*. 1993; 7(7): 1000-4.
- [18] Whitehead VM, Vuchich MJ, Lauer SJ, Mahoney D, Carroll AJ, Shuster JJ, *et al*. Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1992; 80(5): 1316-23.
- [19] Synold TW, Relling MV, Boyett JM, Rivera GK, Sandlund JT, Mahmoud H, *et al*. Blast cell methotrexate- polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 1994; 94(5): 1996-2001.
- [20] Roessner U, Bowne J. What is metabolomics all about?. *BioTech*. 2009; 46(5): 363-5.



- [21] Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2004; 5: 1-7.
- [22] Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008; 48: 653–83.
- [23] Futschik ME, Tschaut A, Chaurasia G, Herzel H. Graph-theoretical comparison reveals structural divergence of human protein interaction networks. *Genome Inform.* 2007; 18: 141-51.
- [24] Cakır T, Hendriks MM, Westerhuis JA, Smilde AK. Metabolic network discovery through reverse engineering of metabolome data. *Metabolomics.* 2009 Sep; 5(3): 318-29.
- [25] Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev.* 2010; DOI: 10.1039/b906712b.
- [26] Kell DB. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7(3): 296-307.
- [27] Gieger C, Geistlinger L, Altmaier E, Hrabé de Angelis M, Kronenberg F, Meitinger T, *et al.* Genetics meets metabolomics: a genome-wide association study of metabolite profiles in human serum. *PLoS Genet.* 2008; 4(11): e1000282.
- [28] Da Silva Neto HG, Da Silva JBP, Pereira GE, Hallwass F. Determination of metabolite profiles in tropical wines by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometrics. *Magn Reson Chem.* 2009; 47: 127–9. DOI: 10.1002/mrc.2520
- [29] Trefi S, Gilard V, Balayssac S, Malet-Martino M, Martino R. The usefulness of 2D DOSY and 3D DOSY-COSY <sup>1</sup>H NMR for mixture analysis: application to genuine and fake formulations of sildenafil (Viagra). *Magn Reson Chem.* 2009; 47: 163–73. DOI: 10.1002/mrc.2490.
- [30] Zhou J, Zhang L, Li X, Chang Y, Gu Q, Lu X, *et al.* Metabolic profiling of transgenic rice progeny using gas chromatography–mass spectrometry: the effects of gene insertion, tissue culture and breeding. *Metab.* 2011; DOI: 10.1007/s11306-011-0338-8.
- [31] Hanhineva K, Rogachev I, Aura AM, Aharoni A, Poutanen K, Mykkänen H. Identification of novel lignans in the whole grain rye bran by non-targeted LC–MS metabolite profiling. *Metab.* 2011; DOI: 10.1007/s11306-011-0325-0.
- [32] Hall R. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol.* 2006; 169: 453–68.
- [33] Whitfield PD, German AJ, Noble PJM. Metabolomics: an emerging post-genomic tool for nutrition. *Brit J Nut.* 2004; 92: 549–55.
- [34] Rubio-Aliaga I, De Roos B, Duthie SJ, Crosley LK, Mayer C, Horgan G, *et al.* Metabolomics of prolonged fasting in humans reveals new catabolic markers. *Metab.* 2010; DOI 10.1007/s11306-010-0255-2.
- [35] Pellis L, van Erk MJ, van Ommen B, Bakker GCM, Hendriks HFJ, Cnubben NHP, *et al.* Plasma metabolomics and proteomics profiling after a postprandial challenge reveal subtle diet effects on human metabolic status. *Metab.* 2011; DOI: 10.1007/s11306-011-0320-5.
- [36] Amorini AM, Giorlandino C, Longo S, D'Urso S, Mesoraca A, Santoro ML, *et al.* Metabolic profile of amniotic fluid as a biochemical tool to screen for inborn errors of metabolism and fetal anomalies. *Mol Cell Biochem.* 2011; DOI 10.1007/s11010-011-1015-y.
- [37] Coen M, Wevers RA, Lindon JC, Blom HJ. High-resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopic investigation of a chick embryo model of neural tube development. *Magn Reson Chem.* 2009; 47: 62–7. DOI: 10.1002/mrc.2534.
- [38] Sumner S, Snyder R, Burgess J, Myers C, Tyl R, Sloan C, *et al.* Metabolomics in the assessment of chemical-induced reproductive and developmental outcomes using non-invasive biological fluids: application to the study of butylbenzyl phthalate. *J. Appl. Toxicol.* 2009; 29: 703–14.
- [39] Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(2): 331-40.
- [40] Tiziani S, Lopes V, Günther UL. Early stage diagnosis of oral cancer using <sup>1</sup>H NMR–based metabolomics. *Neoplasia.* 2009; 11(3): 269–76.
- [41] Vinayavekhin N, Homan EA, Saghatelian A. Exploring disease through metabolomics. *ACS Chem Bio.* 2010; 5(1): 91-103.
- [42] Ludwig C, Ward DG, Martin A, Viant MR, Ismail T, Johnson PJ, *et al.* Fast targeted multidimensional NMR metabolomics of colorectal cancer. *Magn Reson Chem.* 2009; 47: S68–S73. DOI: 10.1002/mrc.2519.

- [43] Bezabeh T, Somorjai RL, Smith ICP. MR metabolomics of fecal extracts: applications in the study of bowel diseases. *Magn Reson Chem.* 2009; 47: 54–61. DOI: 10.1002/mrc.2530.
- [44] Gieger C, Geistlinger L, Altmaier E, Hrabec de Angelis M, Kronenberg F, *et al.* Genetics meets metabolomics: a genome-wide association study of metabolite profiles in human serum. *PLoS Genet.* 2009; 4(11): e1000282. DOI:10.1371/journal.pgen.1000282.
- [45] Van QN, Veenstra TD. How close is the bench to the bedside? Metabolic profiling in cancer research. *Genome Med.* 2009; 1(5). DOI:10.1186/gm5.
- [46] Ng DJY, Pasikanti KK, Chan ECY. Trend analysis of metabonomics and systematic review of metabonomics-derived cancer marker metabolites. *Metab.* 2010; DOI 10.1007/s11306-010-0250-7.
- [47] Wishart DS. Applications of metabolomics in drug discovery and development. *Drugs R D.* 2008; 9(5): 307–22.
- [48] Bohus E, Rácz Á, Noszál B, Coen M, Beckonert O, Keun HC, *et al.* Metabonomic investigations into the global biochemical sequelae of exposure to the pancreatic toxin 1-cyano-2-hydroxy-3-butene in the rat. *Magn Reson Chem.* 2009; 47: 26–35. DOI: 10.1002/mrc.2485.
- [49] Leo GC, Darrow AL. NMR-based metabolomics of urine for the atherosclerotic mouse model using apolipoprotein-E deficient mice. *Magn Reson Chem.* 2009; 47: 20–5. DOI: 10.1002/mrc.2470.
- [50] Trefi S, Gilard V, Balayssac S, Malet-Martino M, Martino R. The usefulness of 2D DOSY and 3D DOSY-COSY <sup>1</sup>H NMR for mixture analysis: application to genuine and fake formulations of sildenafil (Viagra). *Magn Reson Chem.* 2009; 47: 163–73. DOI: 10.1002/mrc.2490.
- [51] Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, *et al.* Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nat.* 2006; 440: 1073–7.
- [52] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics in pharmaceutical R & D. *FEBS Journal.* 2007; 274: 1140–51.
- [53] Nordström A, Lewensohn R. Metabolomics: moving to the clinic. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010; 5(1): 4–17.
- [54] Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HWL, *et al.* Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics. *Nat Med.* 2002; 8: 1439 – 45.
- [55] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, Heller EH, McCarroll R, Wiegand R, *et al.* Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation.* 2005; 3868–75.
- [56] Coen M, O’Sullivan M, Bubb WA, Kuchel PW, Sorrell T. Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics for rapid diagnosis of meningitis and ventriculitis. *Clin Inf Dis.* 2005; 41:1582–90.
- [57] Himmelreich U, Malik R, Kühn T, Daniel HM, Somorjai RL, Dolenko B, *et al.* Rapid etiological classification of meningitis by NMR spectroscopy based on metabolite profiles and host response. *PLoS ONE.* 2009; 4(4): e5328. DOI:10.1371/journal.pone.0005328.
- [58] Jansson J, Willing B, Lucio M, Fekete A, Dicksved J, Halfvarson J., *et al.* Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn’s disease. *PLoS ONE.* 2009; 4(7): e6386. DOI:10.1371/journal.pone.0006386.
- [59] Young SP, Nessim M, Falciani F, Trevino V, Banerjee SP, Scott RAH, *et al.* Metabolomic analysis of human vitreous humor differentiates ocular inflammatory disease. *Mol Vis.* 2009; 15: 1210–7.
- [60] Griffin JL, Nicholls AW. Metabolomics as a functional genomic tool for understanding lipid dysfunction in diabetes, obesity and related disorders. *Pharmacogenomics.* 2006; 7: 1095–107.
- [61] Carraro S, Rezzi S, Reniero F, Heberger K, Giordano G, Zanconato S, *et al.* Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 986–90.
- [62] Wikoff WR, Gangoiti JA, Barshop BA, Siuzdak G. Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism. *Clin Chem.* 2007; 53(12): 2169–76.
- [63] Shlomi T, Cabili MN, Ruppin E. Predicting metabolic biomarkers of human inborn errors of metabolism. *Mol Sys Bio.* 2009; 5(263): 1–8.
- [64] Bell JD, Lee JA, Sadler PJ, Wilkie DR, Woodham RH. Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine-N-oxide. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1096(2): 101–7.
- [65] Rozena S, Cudkowicz ME, Bogdanov M, Matsone WR, Kristald BS, Beecher C, *et al.* Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease. *Metab.* 2005; 1(2): 101–8.
- [66] Bogdanov M, Matson WR, Wang L, Matson T, Saunders-Pullman R, Bressman SS, Beal MF. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson’s disease. *Brain.* 2008; 131: 389–96.

- [67] Wishart DS. Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation. *Am J Transp.* 2005; 5: 2814–20.
- [68] Foxall PJD, Mellotte GJ, Bending MR, Lindon JC, Nicholson JK. NMR spectroscopy as a novel approach to the monitoring of renal transplant function. *Kid Int.* 1993; 43: 234–45.
- [69] Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, Nicholson JK. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(34): 14728–33.
- [70] Sittera B, Bathen TF, Singstad TE, Fjøsne HE, Lundgren S, Halgunset J, *et al.* Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy. *NMR Biomed.* 2010; 23: 424–31.
- [71] Malet-Martino M, Holzgrabeb U. NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biom. Anal.* 2011; 55: 1–15.
- [72] Ross A, Schlotterbeck G, Dieterle F, Senn H. NMR spectroscopy techniques for application to metabolomics. In: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. (ed.). *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics.* Amsterdam: Elsevier; 2007, 55–112.
- [73] Dennison JB, Kulanthaivel P, Barbuch RJ, Renbarger JL, Ehlhardt WJ, Hall SD. Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34(8): 1317–27.
- [74] Aytac S, Yetgin S, Tavit B. Acute and long-term neurologic complications in children with acute lymphoblastic leukemia. *Turk J Pediatr.* 2006;48(1): 1–7.
- [75] Powers R. NMR metabolomics and drug discovery. *Magn Reson Chem.* 2009; 47: 2–11. DOI: 10.1002/mrc.2461.
- [76] Blankenberg FG, Katsikis PD, Storrs RW, Beaulieu C, Spielman D, Chen JY, *et al.* Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood.* 1997; 89(10): 3778–86.
- [77] Rainaldi G, Romano R, Indovina P, Ferrante A, Motta A, Indovina PL, *et al.* Metabolomics using <sup>1</sup>H-NMR of apoptosis and necrosis in HL60 leukemia cells: differences between the two types of cell death and independence from the stimulus of apoptosis used. *Rad. Res.* 2008; 169: 170–80.
- [78] Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova NJ. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 6661–8.
- [79] Dewar BJ, Keshari K, Jeffries R, Dzeja P, Graves LM, Macdonald JM. Metabolic assessment of a novel chronic myelogenous leukemic cell line and an imatinib resistant subline by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Metab.* 2010; 6: 439–50.
- [80] Tiziani S, Lodi A, Khanim FL, Viant MR, Bunce CM, Günther UL. Metabolomic profiling of drug responses in acute myeloid leukaemia cell lines. *PLoS ONE.* 2009; 4(1): e4251. DOI:10.1371/journal.pone.0004251.
- [81] Arakaki AK, Mezencev R, Bowen NJ, Huang Y, McDonald JF, Skolnick J. Identification of metabolites with anticancer properties by computational metabolomics. *Mol Can.* 2008; 7(57). DOI:10.1186/1476-4598-7-57.
- [82] Wilson PK, Mulligan SP, Christopherson RI. Metabolic response patterns of nucleotides in B-cell chronic lymphocytic leukaemias to cladribine, fludarabine and deoxycytidine. *Leuk. Res.* 2004; 28: 725–31.
- [83] MacIntyre DA, Jiménez B, Lewintre EJ, Martín CR, Schäfer H, Ballesteros CG, *et al.* Serum metabolome analysis by <sup>1</sup>H-NMR reveals differences between chronic lymphocytic leukaemia molecular subgroups. *Leuk.* 2010; 24: 788–97.
- [84] Cano KE, Li L, Bhatia S, Bhatia R, Forman SJ, Chen Y. NMR-based metabolomic analysis of the molecular pathogenesis of therapy-related myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *J. Proteome Res.* 2011; 10: 2873–81.
- [85] Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 1986;93(2): 157–65.
- [86] Le Belle JE, Harris NG, Williams SR, Bhakoo KK. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* 2002;15(1): 37–44.
- [87] Maton A, Hopkins J, McLaughlin CW, Johnson S, Warner MQ, LaHart D, Wright JD. *Human Biology and Health.* Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall; 1993. 256p.
- [88] Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nuc. Aci. Res.* 2009; 37: W652–W60. DOI:10.1093.

- [89] Cardillo G. Clinical test performance: the performance of a clinical test based on the Bayes theorem. Website disponível em: < <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/12705>>. Último acesso: 26 de junho de 2011.
- [90] Lee MLM. Análise da Infusão curta ambulatorial do Methotrexate em doses intermediárias em crianças portadoras de Leucemia Linfóide Aguda [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo – EPM; 1999.
- [91] Wishart DS, Knox C, Guo AC, *et al.* HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: D603-10.
- [92] Bognoux P, Chajes V, Lanson M, Hacene K, Body G, Couet C, *et al.* Prognostic significance of tumor phosphatidylcholine stearic acid level in breast carcinoma. *Breast Cancer Res and Treat.* 2005; 20 (3): 185-94.
- [93] Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, *et al.* Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature.* 2009; 457, 910-14.
- [94] King A, Selak MA, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene.* 2006; 25, 4675–82.
- [95] Abramovitch R, Tavor E, Jacob-Hirsch J, Zeira E, Amariglio N, Pappo O, *et al.* A Pivotal Role of Cyclic AMP-Responsive Element Binding Protein in Tumor Progression. *Cancer Res.* 2004; 64 1338-46.
- [96] Simpson BJ, Ramage AD, Hulme MJ, Burns DJ, Katsaros D, Langdon SP, *et al.* Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-binding proteins in human ovarian cancer: correlations with clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 1996; 2: 201-6.
- [97] Dumaz N, Hayward R, Martin J, Ogilvie L, Hedley D, Curtin JA, *et al.* In Melanoma, RAS Mutations Are Accompanied by Switching Signaling from BRAF to CRAF and Disrupted Cyclic AMP Signaling. *Cancer Res.* 2006; 66: 9483-91.
- [98] Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME. Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 1994 Jun 3; 77(5): 713-25.
- [99] Shankar DB, Cheng JC, Sakamoto KM. Role of cyclic AMP response element binding protein in human leukemias. *Cancer* 2005 Nov 1; 104(9): 1819-24.
- [100] Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, *et al.* CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* Mar 10; 471(7337): 235-9.
- [101] Foa R, Massaia M, Cardona S, Tos AG, Bianchi A, Attisano C, *et al.* Production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. *Blood* 1990 Jul 15; 76(2): 393-400.
- [102] Kobayashi D, Watanabe N, Yamauchi N, Tsuji N, Sato T, Niitsu Y. Endogenous tumor necrosis factor as a predictor of doxorubicin sensitivity in leukemic patients. *Blood* 1997 Apr 1; 89(7): 2472-9.
- [103] Gu L, Findley HW, Zhu N, Zhou M. Endogenous TNF $\alpha$  mediates cell survival and chemotherapy resistance by activating the PI3K/Akt pathway in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 2006 May; 20(5): 900-4.
- [104] Potapnev MP, Petyovka NV, Belevtsev MV, Savitskiy VP, Migal NV. Plasma level of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) correlates with leukocytosis and biological features of leukemic cells, but not treatment response of children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003 Jun; 44(6): 1077-9.
- [105] Cloppenborg T, Stanulla M, Zimmermann M, Schrappe M, Welte K, Klein C. Immunosurveillance of childhood ALL: polymorphic interferon- $\gamma$  alleles are associated with age at diagnosis and clinical risk groups. *Leukemia* 2005; 19: 44–8.
- [106] Buschle M, Campana D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV, Brenner MK. Interferon  $\gamma$  inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1993 Jan; 177: 213-8.
- [107] Lee SK, Na SY, Jung SY, Choi JE, Jhun BH, Cheong J, *et al.* Activating protein-1, nuclear factor- $\kappa$ B, and serum response factor as novel target molecules of the cancer-amplified transcription coactivator ASC-2. *Mol Endocrinol.* 2000; 14(6): 915-25.
- [108] Volm M, Zintl F, Edler L, Sauerbrey A. Prognostic value of protein kinase C, proto-oncogene products and resistance-related proteins in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1997; 28: 117–26.

- [109] Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 2009; 459 (7249): 996-9.
- [110] López-Lázaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett*. 2007; 252(1): 1-8.
- [111] Nath N, Chattopadhyay M, Kodela R, Tian S, Vlismas P, Boring D, Crowell JA, *et al*. Modulation of stress genes expression profile by nitric oxide-releasing aspirin in Jurkat T leukemia cells. *Biochem Pharm* 2010; 79: 1759–71.
- [112] Bui T, Thompson CB. Cancer's sweet tooth. *Cancer Cell*. 2006; 419-20.
- [113] Kim J, Dang CV. Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect. *Cancer Res*. 2006; 66: 8927-30.
- [114] Gottlieb E, Tomlinson IP. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(11): 857-66.
- [115] Gatenby RA, Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(1): 56-61.
- [116] Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Applied Phys*. 2000; 88(4): 1474-80.
- [117] Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, *et al*. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399(6733): 271-5.
- [118] Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2004; 30(5): 465-8.
- [119] Van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J*. 2008; 412(3): 477-84.
- [120] Wellmann S, Guschmann M, Griethe W, Eckert C, Stackelberg A, Lottaz C, *et al*. Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia* 2004; 18: 926–33.
- [121] Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*. 1927; 8: 519–30.
- [122] Eliyahu G, Kreizman T, Degani H. Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: Molecular and biochemical studies. *Intern J Cancer*. 2007; 120(8): 1721–30.
- [123] Pui CH, Dodge RK, Dahl GV, Rivera G, Look AT, Kalwinsky D, *et al*. Serum lactic dehydrogenase level has prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1985; 66(4): 778-82.
- [124] Koivunen P, Hirsilä M, Remes AM, Hassinen IE, Kivirikko KI, Myllyharju J. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem*. 2007; 282(7): 4524-32
- [125] Esteban MA, Maxwell PH. HIF, a missing link between metabolism and cancer. *Nature Med*. 2005; 11: 1047-48.
- [126] Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, *et al*. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: Novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell*. 2005; 8: 143-53.
- [127] Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res*. 2005; 589(1): 47-65.
- [128] Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K. Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(27): 3329-40.
- [129] Cronin J, Williams L, McAdam E, Eltahir Z, Griffiths P, Baxter J, *et al*. The role of secondary bile acids in neoplastic development in the oesophagus. *Biochem Soc Trans*. 2010; 38(2): 337-42.
- [130] Jenkins GJS, Cronin J, Alhamdani A, Rawat N, D'Souza F, Thomas T, *et al*. The bile acid deoxycholic acid has a non-linear dose response for DNA damage and possibly NF-kB activation in oesophageal cells, with a mechanism of action involving ROS. *Mutagenesis*. 2008; 23(5): 399–405.
- [131] Lo YL, Ho CT, Tsai FL. Inhibit multidrug resistance and induce apoptosis by using glycocholic acid and epirubicin. *Eur J Pharm Sci*. 2008; 35(1-2): 52-67.
- [132] Liao M, Zhao J, Wang T, Duan J, Zhang Y, Deng X. Role of bile salt in regulating Mcl-1 phosphorylation and chemoresistance in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer*. 2011; 10 (44). DOI:10.1186/1476-4598-10-44.
- [133] Bernt C, Vennegeerts T, Beuers U, Rust C. The human transcription factor AP-1 is a mediator of bile acid-induced liver cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 340(3): 800-6.

- [134] Zeng H, Liu G, Rea PA, Kruh GD. Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res* 2000 Sep; 60: 4779–84.
- [135] Ansari M, Sauty G, Labuda M, Gagne V, Rousseau J, Moghrabi A, *et al.* Polymorphism in multidrug resistance-associated protein gene 3 is associated with outcomes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* 2009 May; 114(7): 1383-6.
- [136] Steinbach D, Wittig S, Cario G, Viehmann S, Mueller A, Gruhn B, *et al.* The multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3) is associated with a poor outcome in childhood ALL and may account for the worse prognosis in male patients and T-cell immunophenotype. *Blood* 2003 Dec; 102(13): 4493-8.
- [137] Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. *Lehninger principles of biochemistry*. 4<sup>a</sup> edição. W.H. Freeman: New York, 2005.
- [138] Johnson RK, Inouye T, Goldin A, Stark GR. Antitumor activity of N-(phosphonacetyl)-L-aspartic acid, a transition-state inhibitor of aspartate transcarbamylase. *Cancer Res* 1976 Aug; 36(8): 2720-5.
- [139] Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, *et al.* Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*. 2009; 457, 910-14.
- [140] Wagner C, Luka Z. Sarcosine, Folate Metabolism and Prostate Cancer—Is There a Link?. *The J Urol*. 2011; 185: 385-6.
- [141] Yang SY, Hong CJ, Huang YH, Tsai SJ. The effects of glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), on ketamine-induced alterations in sensorimotor gating and regional brain c-Fos expression in rats. *Neurosci Lett*. 2010; 469(1): 127-30
- [142] Dahl M, Bouchelouche P, Kramer-Marek G, Capala J, Nordling J, Bouchelouche K. Sarcosine induces increase in HER2/neu expression in androgen-dependent prostate cancer cells. *Mol Biol Rep*. 2011; 38(7): 4237-43.
- [143] Borum PR. Carnitine. *Annu Rev Nutr* 1983; 3: 233-59.
- [144] Sima AAF, Calvani M, Mehra M, Amato A. Acetyl-L-Carnitine Improves Pain, Nerve Regeneration, and Vibratory Perception in Patients With Chronic Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*. 2005; 28: 96–101.
- [145] Bykov I, Järveläinen H, Lindros K. L-carnitine alleviates alcohol-induced liver damage in rats: role of tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Alcoh & Alcoh*. 2003; 38(5): 400–6.
- [146] Sayed-Ahmed MM. Role of carnitine in cancer chemotherapy-induced multiple organ toxicity. *Saudi Pharm J*. 2010; 18: 195–206.
- [147] Sener G, Eksioglu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, *et al.* L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *Cell Biol Tox*. 2006; 22: 47–60.
- [148] Delaney CE, Hopkins SP, Addison CL. Supplementation with L carnitine does not reduce the efficacy of epirubicin treatment in breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2007; 252: 195–207.
- [149] Aouida M, Poulin R, Ramotar D. The Human Carnitine Transporter SLC22A16 Mediates High Affinity Uptake of the Anticancer Polyamine Analogue Bleomycin-A5. *J Biol Chem*. 2010; 285 (9): 6275–84.
- [150] Gibellini F, Smith TK. The Kennedy Pathway—De Novo Synthesis of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. 2010; 62(6): 44–28.
- [151] De Molina AR, Rodríguez-González A, Gutiérrez R, Martínez-Piñeiro L, Sánchez J, Bonilla F, *et al.* Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Com*. 2002; 96(3): 580–3.
- [152] Miyake T, Parsons SJ. Functional interactions between Choline kinase  $\alpha$ , epidermal growth factor receptor and c-Src in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*. 2011. DOI:10.1038/onc.2011.332.
- [153] Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*. 2005; 1(1): 2005.0010.
- [154] Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004; 304(5676): 1497–500.
- [155] Walker F, Abramowitz L, Benabderrahmane D, Duval X, Descatoire V, Hénin D. Growth factor receptor expression in anal squamous lesions: modifications associated with oncogenic human papillomavirus and human immunodeficiency virus. *Hum Pathol*. 2009; 40(11): 1517-27.
- [156] Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer*. 2001; 8(2): 83-96.

- [157] Oxnard GR, Miller VA. Use of erlotinib or gefitinib as initial therapy in advanced NSCLC. *Oncology* (Williston Park). 2010; 24(5): 392-9.
- [158] Blick SK, Scott LJ. Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer. *Drugs*. 2007; 67(17): 2585-607.
- [159] Oneyama C, Morii E, Okuzaki D, Takahashi Y, Ikeda J, Wakabayashi N, *et al.* MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase promotes Src-induced tumor progression. *Oncogene*. 2011. DOI: 10.1038/onc.2011.367.
- [160] Gnoni A, Marech I, Silvestris N, Vacca A, Lorusso V. Dasatinib: an anti-tumour agent via Src inhibition. *Curr Drug Targets*. 2011; 12(4): 563-78.
- [161] Deininger M. Src kinases in Ph+ lymphoblastic leukemia. *Nat Gen* 2004 may; 36(5): 440-1.
- [162] Eliyahu G, Kreizman T, Degani H. Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: molecular and biochemical studies. *Int J Cancer* 2007 Apr; 120(8): 1721-30.
- [163] Chua BT, Gallego-Ortega D, Ramirez de Molina A, Ullrich A, Lacal JC, Downward J. Regulation of Akt(ser473) phosphorylation by choline kinase in breast carcinoma cells. *Mol Cancer* 2009; 8: 131.
- [164] Faissner A, Heck N, Dobbertin A, Garwood J. DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues. *Adv Exp Med Biol* 2006; 557: 25-53.
- [165] Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J* 2011 Feb; 278(3): 403-413.
- [166] Ng Y, Ramm G, Lopez JA, James DE. Rapid activation of Akt2 is sufficient to stimulate GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Cell Metab* 2008 Apr; 7(4): 348-56.
- [167] Chen J, Somanath PR, Razorenova O, Chen WS, Hay N, Bornstein P, *et al.* Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat Med* 2005 Nov; 11(11): 1188-96.
- [168] Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, *et al.* Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(5): 2110-5.
- [169] Kandel ES, Skeen J, Majewski N, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Feliciano CS, *et al.* Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(22): 7831-41.

## APÊNDICE 1

### **EMPREGO DE MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO E CO-CULTURA COM LINHAGEM DE CÉLULA ESTROMAL DE MEDULA ÓSSEA NA RECUPERAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E ESTABILIDADE DE LINHAGEM LEUCÊMICA LINFÓIDE**

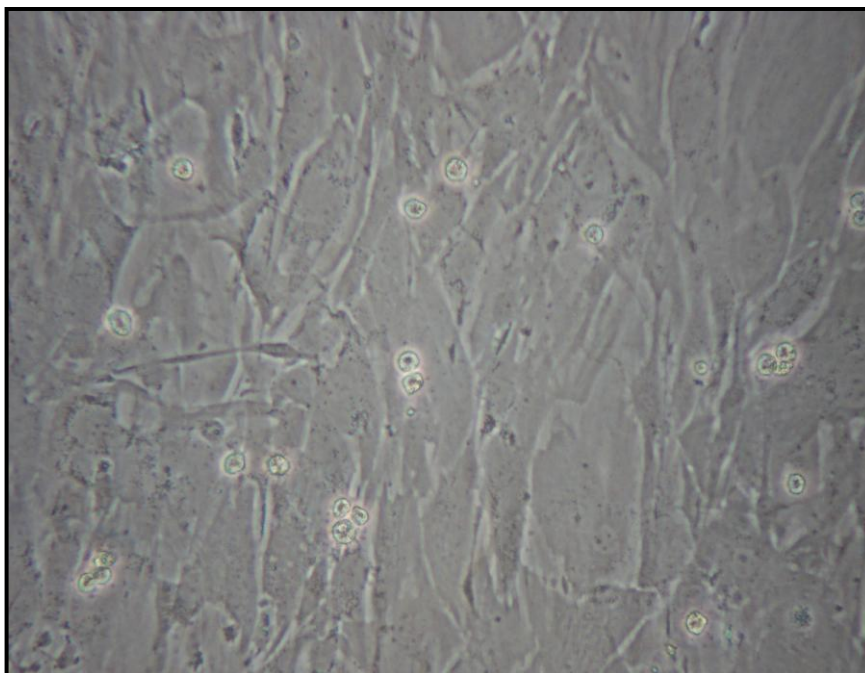
Antes do início deste projeto, a linhagem Nalm 30 apresentou crescimento insatisfatório. Por isso, tentamos a sua co-cultura com uma linhagem de células estromais de medula óssea. Esta linhagem aderente tem a propriedade de suportar linfoblastos e células hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> normais de forma tão eficiente (ou até maior) do que células primárias [1], e é conhecida como “hTERT” por expressar grande quantidade de transcriptase reversa de telomerase – a subunidade protéica catalítica do complexo da telomerase – conferindo a estas células a capacidade de se expandirem indefinidamente, sem prejuízo de sua taxa de crescimento fisiológico e características funcionais gerais [1,2].

A linhagem Nalm 30 necessitou ainda de meio de cultura suplementado para replicar satisfatoriamente durante sua co-cultura com hTERT. O meio de cultura suplementado era composto por 85% de RPMI-1640 acrescido de 15% de soro fetal bovino, 2 mmol/L de L-glutamina, 5 µg/mL de insulina, transferrina e selênio (ITS), 100 UI/mL penicilina, 100 pg/mL estreptomicina e  $1 \times 10^{-6}$  mol/L hidrocortisona. A co-cultura tinha metade do volume de seu meio trocada a cada 3 dias, sendo devolvidas à co-cultura, após centrifugação, as células de leucemia que estavam na alíquota a ser descartada.

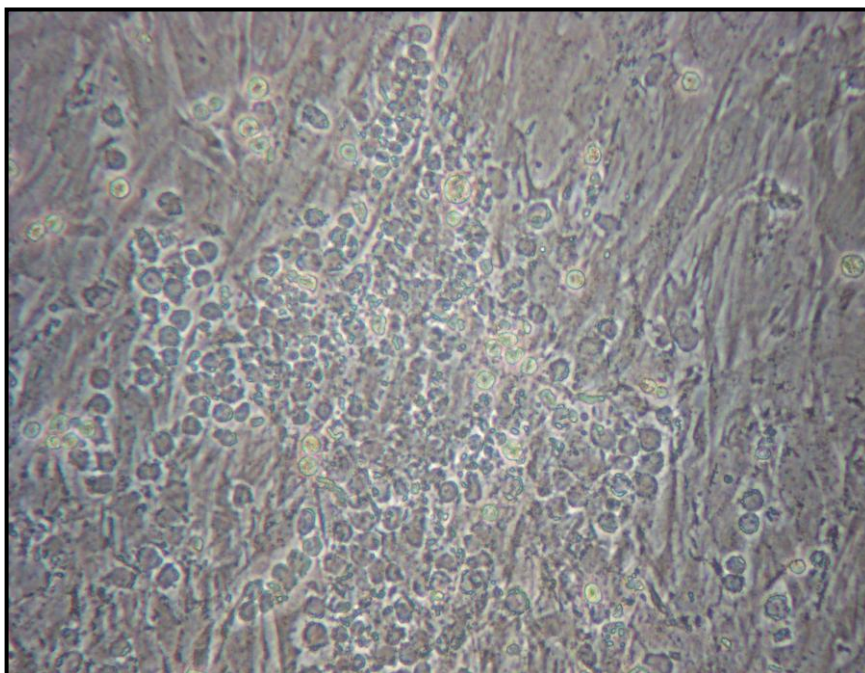
Após 60 dias de co-cultura, foi observada uma grande quantidade de células não aderentes (linhagem leucêmica) com alta capacidade de replicação (Figura 19). A recuperação da capacidade proliferativa foi comprovada quando estas células foram transferidas para meio de cultura convencional (não suplementado e sem co-cultura com hTERT), sendo observado um crescimento populacional satisfatório.



A



B



**Figura 19.** Co-cultura de Nalm 30 com hTERT em dois momentos. (A) Início da co-cultura: é possível ver as hTERT aderentes ao fundo e algumas Nalm 30 circulares sobrenadantes. (B) Término do período de co-cultura: uma grande quantidade de células leucêmicas interiorizou-se abaixo das hTERT (círculos escuros), onde recebem sinalização química da linhagem estromal aderente. Os círculos claros esverdeados são células leucêmicas que emergiram do contato com as hTERT, e que apresentam alta capacidade de replicação quando transferidas para meio de cultura convencional. (Aumento de 200x).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Mihara K, Imai C, Coustan-Smith E, Dome JS, Dominici M, Vanin E, *et al.* Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *Br J Haematol.* 2003; 120(5): 846-9.

[2] Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, *et al.* Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet.* 1999; 21(1): 111-4.

## APÊNDICE 2

### INFORMAÇÕES DETALHADAS DAS LINHAGENS LEUCÊMICAS EMPREGADAS NESTE ESTUDO

**Tabela 5.** Informações genéticas e clínicas das linhagens T- e B- derivadas classificadas como resistentes ao MTX.

| Linhagem     | Tipo               | Sexo                  | Sítio/ Ocasão     | Cariótipo                                                                                                                                       | Alteração gênica                                             | Particularidades                                                          | Genes de Receptores                                                           | Citocinas Produzidas       |
|--------------|--------------------|-----------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| HPB-ALL      | T-derivada imatura | M                     | S.P./ diagnóstico | 94-96, XXY, -3, -3, -9, -16, -16, -18, +19, +4mar, t(1;5)(q23;q25)x2, del(2)(p22)x2, add(14)(q32), +del(20)(q11)x2, +del(22)(q21)x2             | IFNB, P15INK4B e P16INK4A deletados                          | t(5;14)(q35;q32.2); genes alterados: HOX11L2/TLX3-BCL11B                  | IGH R, IGK G, TRA R, TRB R, TRG R, TRD D (mRNA: IGH-, TRA+, TRB+, TRG+, TRD-) | mRNA+ para GM-CSF e TGF-β1 |
| SIL-ALL      | T-derivada imatura | M                     | S.P./ recaída     | 90-95<4n>XX/XXYY, +6, +8, +8, t(1;13)(p32;q32)x2, del(6)(q25)x2, del(9)(?p23p24)x2, t(10;14)(q24;q11.2)x2, add(17)(p11)x2                       | IFNA, IFNB, P15INK4B, P16INK4A e RB1 deletados               | t(10;14)(q24;q11); alteração gênica: HOX11-TRD; fusão gênica: NUP214-ABL1 |                                                                               | mRNA+ para GM-CSF e TGF-β1 |
| P12-Ichikawa | T-derivada imatura | M                     | S.P./ (?)         | 82-84<4n>XX, -Y, -Y, -2, +6, -9, -9, -10, -14, +20, -21, -21, -22, -22, +mar, der(2;9)(p10;q10), del(4)(q25), der(10;22)(q10;q10), add(19)(q13) | NRAS e P53 mutados, P15INK4B rearranjado e P16INK4A deletado |                                                                           | IGH G, IGK G, TRA G, TRB R, TRG R, TRD R                                      |                            |
| Nalm 16      | Precursora-B       | F                     | S.P./recaída      | 27, X, +10, +14, +18, +21, 7p+                                                                                                                  | P16INK4A deletado                                            |                                                                           | IGH RR, TRB RG, TRG RG                                                        |                            |
| Nalm 30      | Precursora-B       | DADOS NÃO ENCONTRADOS |                   |                                                                                                                                                 |                                                              |                                                                           |                                                                               |                            |

**Tabela 6.** Informações genéticas e clínicas das linhagens T- e B- derivadas classificadas como sensíveis ao MTX.

| Linhagem        | Tipo                   | Sexo | Sítio/<br>Oca-<br>são               | Cariótipo                                                                                                                                                                                                        | Alteração gênica                                        | Particularidades                                                                                                     | Genes de Receptores                                                              | Citocinas<br>Produzidas              |
|-----------------|------------------------|------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| CCRF-CEM        | T-derivada,<br>imatura | F    | S.P./<br>Recaída<br>LLA<br>terminal | 90(88-101)<4n>XX, -X, -X, +20,<br>+20,t(8;9)(p11;p24)x2, der(9)del(9)(p21-<br>22)del(9)<br>(q11q13-21)x2;                                                                                                        | IFNA, IFNB e P16INK4A<br>deletados; P53 mutado          | del(1)(p32) submicroscópica:<br>fusão SIL-SCL; t(5;14)<br>(q35.1;q32.2): genes NKX2-<br>5-BCL11B alterados           | IGH G, IGK G, TRA R,<br>TRB R, TRG R, TRD D<br>(mRNA: TRA+, TRB+,<br>TRG+, TRD-) | mRNA+<br>para TGF-β                  |
| MOLT-4          | T-derivada,<br>imatura | M    | S.P./<br>recaída                    | 98(94-101)<4n>XXYY, +6, +7, +8, +8, +17,<br>+20, del(6)(q16)x2, der(7)t(7;7)(p15;q11)x2                                                                                                                          | NRAS mutado,<br>P16INK4A deletado                       |                                                                                                                      | IGH G, IGK G, TRA R,<br>TRB R, TRG G, TRD D<br>(mRNA: TRA+, TRB+)                | mRNA+<br>para TGF-β                  |
| JURKAT-<br>ECII | T-derivada,<br>imatura | M    | S.P./<br>recaída                    | 87(78-91)<4n>XX, -Y, -Y, -5, -16, -17, -22,<br>add(2)(p21)/del(2)(p23)x2                                                                                                                                         | IFNA, P15INK4B<br>e P16INK4A deletados,<br>P53 mutado   |                                                                                                                      | IGH R, IGK G, TRA R,<br>TRB R, TRG R, TRD D<br>(mRNA: TRA+, TRB+,<br>TRG-, TRD-) | mRNA+<br>para GM-<br>CSF e<br>TGF-β1 |
| SUP-T1          | T-derivada,<br>imatura | M    | Efusão<br>Pleural/<br>recaída       | 85<4n>XXX/XXX?Y, -8, -8, -9, -<br>12,inv(2)(p22q11)x2, t(2;?20)(p13;?p11),<br>del(4)(q31q35), del(6)(q25)x2, add(7)(q32),<br>add(9)(q34)x2, inv(14)(q11q32)x2                                                    | P15INK4B e P16INK4A<br>deletados                        | t(7;9)(q34;q34.3):<br>genes TRB-TAN1 alterados;<br>inv(14)(q11q32):<br>genes TRA-IGH alterados                       | IGH G, IGK R,<br>TRB R, TRG R, TRD D                                             |                                      |
| TALL            | T-derivada,<br>imatura | M    | M.O/<br>terminal                    | 90-102<4n>XXY/XXYY, -3, -9, -12, +13,<br>+14, +14, -15,+20, +20, +21, +21, +2-4mar,<br>der(X;1)(p10;p10)/<br>add(1)(q11), add(1)(p11), add(5)<br>(p1?5), del(2)(p22p24), del(12)(q24.1),<br>dup(21)(q11qter)x3-4 | P15INK4B e P16INK4A<br>deletados, NRAS<br>e P53 mutados |                                                                                                                      |                                                                                  |                                      |
| Nalm 06         | Precursor-<br>B        | M    | S.P./<br>recaída                    | 46(43-47)<2n>XY, t(5;12)(q33.2;p13.2)                                                                                                                                                                            | P15INK4B e P16INK4A<br>deletados                        |                                                                                                                      | IGH RG, TRB GG,<br>TRG GG                                                        |                                      |
| REH             | Precursor-<br>B        | F    | S.P./<br>recaída                    | 46(44-47)<2n>X, -X, +16, del(3)(p22),<br>t(4;12;21;16)(q32;p13;q22;q24.3)inv(12)(p13q<br>22), t(5;12)(q31-q32;p12),<br>der(16)t(16;21)(q24.3;q22)                                                                | P15INK4B e P16INK4A<br>deletados                        | t(12;21)(p13;q22): fusão<br>ETV6/TEL-RUNX1/AML1;<br>mRNA <sup>+</sup> para protooncogenes:<br>BAX, BCL2, BCLXL, MDM2 | IGH RR                                                                           |                                      |
| RS4;11          | Precursor<br>-B        | F    | M.O/<br>recaída                     | 47/48<2n>X/XX, +8, +18, t(4;11)(q21;q23),<br>i(7q)                                                                                                                                                               | P15INK4B e P16INK4A<br>deletados                        | Protooncogenes HOX<br>e MEIS superexpressos                                                                          | IGH RG, IGK RD,<br>TRB G, TRG G                                                  |                                      |
| 697             | Precursor<br>-B        | M    | M.O/<br>recaída                     | 46(45-48)<2n>XY, t(1;19)(q23;p13),<br>del(6)(q21)                                                                                                                                                                | P53 mutado                                              | t(1;19)(q23;p13): fusão<br>TCF3/E2A-PBX1; mRNA <sup>+</sup> para<br>protooncogenes: BAX, BCL2,<br>BCLXL, MDM2        |                                                                                  | Inibido por<br>TNF-α                 |

FONTE: Drexler HG. Guide to Leukemia-Lymphoma Cell Lines. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Braunschweig, Alemanha. 2005; 684p.

## APÊNDICE 3

### PADRONIZAÇÕES

#### BIOREATOR MINIPERM E GARRAFAS PARA CULTURA CELULAR

O Bioreator MiniPERM (*Greiner*) é um biorator constituído de um módulo de nutrição (350 – 400 mL), preenchido com meio de cultura, separado por uma membrana semi-permeável de um módulo de produção (35mL), no qual estão confinadas as células de interesse (Figura 20). Esta membrana permite que nutrientes do módulo de nutrição entrem no módulo de produção, mas impede que células ou grandes moléculas (como anticorpos) percorram o caminho oposto. Os bioreatores são dispostos numa esteira giratória, colocada dentro da estufa de incubação. O Bioreator MiniPERM é recomendado principalmente para a obtenção de anticorpos monoclonais, ainda que o fabricante também o sugira para a produção de biomassa.

Entretanto, a necessidade de esterilização freqüente do módulo de nutrição, a descartabilidade de muitos acessórios utilizados em sua manipulação cotidiana (seringas, agulhas, reagentes e septos de vedação próprios), o grande volume de meio de cultura necessário para preencher o módulo de nutrição (de volume não-regulável) e o pequeno número de bioreatores que cabiam simultaneamente na esteira giratória (4 bioreatores) acabaram por tornar o Bioreator MiniPERM incompatível com nossas necessidades e demandas.

A alternativa encontrada foi a utilização de garrafas de cultura celular (*Sarstedt*) com área de cultura de 175 cm<sup>2</sup>. As suas maiores vantagens são o fácil manuseio, o menor volume de meio de cultura requerido e o menor espaço físico ocupado dentro da estufa incubadora (Figura 20).

Para avaliar o impacto e a influência do recipiente de cultura no *pool* metabólico das células, realizamos um teste com a linhagem B-derivada REH, cultivada com 25 nM de MTX no bioreator MiniPERM e em garrafa de cultura celular, por 24 horas. Os compostos quantificados no conteúdo intra e extracelular estão na Tabela 7 e 8, respectivamente.



**Figura 20.** MiniPERM e garrafas de cultura. À esquerda, um Bioreator MiniPERM. À direita, garrafas para cultura celular contendo linhagens em meio de cultura.

**Tabela 7.** Concentrações de metabólitos (mmol/L) identificados no meio de cultura de REH após 24h de cultivo em bioreator MiniPERM (M) e em garrafa de cultura celular (G) na presença de 25nM de MTX.

| Metabólito        | M     | G     | M/G         | Metabólito                | M     | G     | M/G         |
|-------------------|-------|-------|-------------|---------------------------|-------|-------|-------------|
| 2-Oxoisocaproato  | 0,003 | 0,005 | <b>0,54</b> | Glicina                   | 0,111 | 0,188 | <b>0,59</b> |
| 3-Hidroxibutirato | 0,021 | 0,000 | -           | Histidina                 | 0,099 | 0,066 | <b>1,50</b> |
| 5,6-Dihidrotimina | 0,000 | 0,045 | <b>0</b>    | Isobutirato               | 0,009 | 0,000 | -           |
| Acetato           | 0,169 | 0,018 | <b>9,30</b> | Isoleucina                | 0,075 | 0,166 | <b>0,45</b> |
| Acetona           | 0,001 | 0,003 | <b>0,21</b> | Lactato                   | 2,068 | 0,769 | <b>2,69</b> |
| Alanina           | 0,052 | 0,080 | <b>0,66</b> | Leucina                   | 0,114 | 0,150 | <b>0,76</b> |
| Alantoína         | 0,062 | 0,092 | <b>0,67</b> | Lisina                    | 0,050 | 0,086 | <b>0,58</b> |
| Aloisoleucina     | 0,011 | 0,000 | -           | Malonato                  | 0,027 | 0,017 | <b>1,58</b> |
| Arginina          | 0,236 | 0,517 | <b>0,46</b> | Metionina                 | 0,024 | 0,041 | <b>0,59</b> |
| Asparagina        | 0,110 | 0,188 | <b>0,58</b> | Fosfocolina               | 0,017 | 0,004 | <b>4,68</b> |
| Aspartato         | 0,054 | 0,091 | <b>0,60</b> | Ornitina                  | 0,052 | 0,052 | <b>1,00</b> |
| Betaina           | 0,016 | 0,013 | <b>1,25</b> | Pantotenato               | 0,007 | 0,008 | <b>0,93</b> |
| Carnitina         | 0,014 | 0,005 | <b>2,67</b> | Fenilalanina              | 0,041 | 0,042 | <b>0,98</b> |
| Colina            | 0,000 | 0,013 | <b>0</b>    | Prolina                   | 0,111 | 0,132 | <b>0,84</b> |
| Citrato           | 0,012 | 0,023 | <b>0,51</b> | Piroglutamato             | 0,206 | 0,210 | <b>0,98</b> |
| Creatina          | 0,018 | 0,020 | <b>0,91</b> | Piruvato                  | 0,010 | 0,225 | <b>0,04</b> |
| Creatinina        | 0,021 | 0,020 | <b>1,03</b> | Sarcosina                 | 0,006 | 0,041 | <b>0,14</b> |
| Cistina           | 0,063 | 0,075 | <b>0,84</b> | Succinato                 | 0,049 | 0,041 | <b>1,20</b> |
| Formato           | 0,067 | 0,094 | <b>0,72</b> | Treonina                  | 0,050 | 0,079 | <b>0,64</b> |
| Frutose           | 0,366 | 0,380 | <b>0,96</b> | Tirosina                  | 0,048 | 0,074 | <b>0,64</b> |
| Glicose           | 3,759 | 3,468 | <b>1,08</b> | Valina                    | 0,036 | 0,073 | <b>0,50</b> |
| Glutamato         | 0,118 | 0,233 | <b>0,51</b> | Mio-Inositol              | 0,168 | 0,169 | <b>1,00</b> |
| Glutamina         | 0,337 | 0,605 | <b>0,56</b> | trans-4-Hidroxi-L-prolina | 0,070 | 0,134 | <b>0,52</b> |

**Tabela 8.** Concentrações de metabólitos (mmol/L) identificados no extrato celular de REH após 24h de cultivo em bioreator MiniPERM (M) e garrafa de cultura celular (G) na presença de 25nM de MTX.

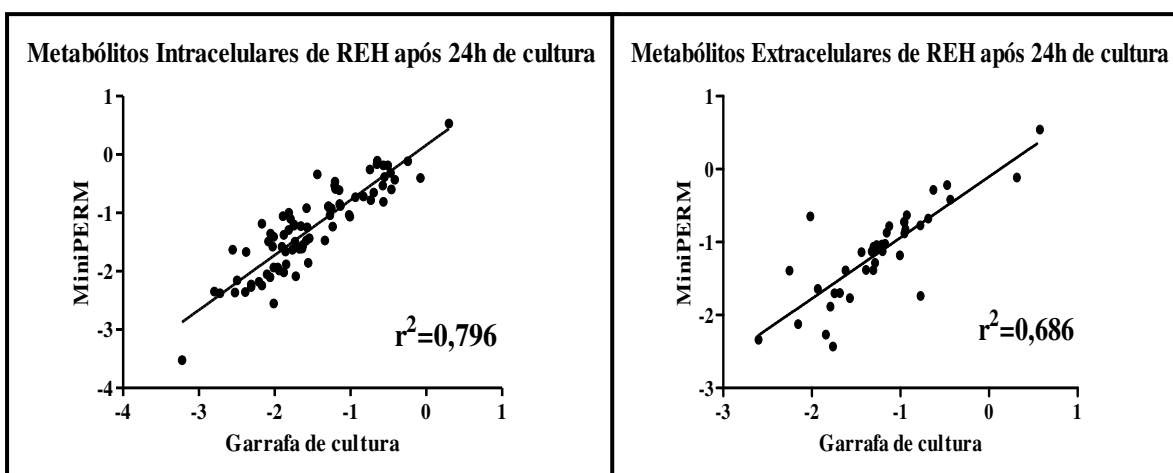
| Metabólito            | M      | G      | M/G         | Metabólito                | M      | G      | M/G         |
|-----------------------|--------|--------|-------------|---------------------------|--------|--------|-------------|
| 2-Metilglutarato      | 0      | 0,0036 | <b>0</b>    | Glicina                   | 0,2729 | 0,6506 | <b>0,42</b> |
| 2-Oxobutirato         | 0,0049 | 0,0054 | <b>0,91</b> | Glicocolato               | 0,0049 | 0,0059 | <b>0,83</b> |
| 2-Oxoglutarato        | 0,0132 | 0,0096 | <b>1,38</b> | GTP                       | 0,0269 | 0,0563 | <b>0,48</b> |
| 3-Hidroxiisovalerato  | 0,0062 | 0,0066 | <b>0,94</b> | Guanosina                 | 0,0132 | 0,0421 | <b>0,31</b> |
| 4-Aminobutirato       | 0,0278 | 0,0139 | <b>2,00</b> | Histidina                 | 0,0584 | 0,0581 | <b>1,01</b> |
| 4-Hidroxifenilacetato | 0,0032 | 0,007  | <b>0,46</b> | Isoleucina                | 0,0179 | 0,0602 | <b>0,30</b> |
| 5,6-Dihidrotimina     | 0,0087 | 0,0079 | <b>1,10</b> | Lactato                   | 0,347  | 0,2526 | <b>1,37</b> |
| Acetato               | 0,023  | 0,0245 | <b>0,94</b> | Leucina                   | 0,0153 | 0,051  | <b>0,30</b> |
| ADP                   | 0,0624 | 0,3442 | <b>0,18</b> | Lisina                    | 0,0232 | 0,0268 | <b>0,87</b> |
| Alanina               | 0,0263 | 0,121  | <b>0,22</b> | Malato                    | 0,1482 | 0,1916 | <b>0,77</b> |
| AMP                   | 0,0538 | 0,1168 | <b>0,46</b> | Malonato                  | 0,011  | 0,0116 | <b>0,95</b> |
| Arginina              | 0,0738 | 0,1318 | <b>0,56</b> | Metionina                 | 0,0097 | 0,0116 | <b>0,84</b> |
| Asparagina            | 0,0616 | 0,2953 | <b>0,21</b> | mio-inositol              | 0,5699 | 0,7671 | <b>0,74</b> |
| Aspartato             | 0,3117 | 0,651  | <b>0,48</b> | Dimetilglicina            | 0,0068 | 0,0057 | <b>1,19</b> |
| ATP                   | 0,0129 | 0,0877 | <b>0,15</b> | NAD+                      | 0,0028 | 0,0233 | <b>0,12</b> |
| Carnitina             | 0,019  | 0,0082 | <b>2,32</b> | NADP+                     | 0,0042 | 0,0215 | <b>0,20</b> |
| CB-01                 | 0,056  | 0,1199 | <b>0,47</b> | Niacinamida               | 0,0083 | 0,0325 | <b>0,26</b> |
| CB-02                 | 0,1812 | 0,5543 | <b>0,33</b> | O-Acetilcarnitina         | 0,0016 | 0,0045 | <b>0,36</b> |
| CB-05                 | 0,203  | 0,2236 | <b>0,91</b> | Fosfocolina               | 0,2261 | 0,7843 | <b>0,29</b> |
| CB-06                 | 0,0511 | 0,1307 | <b>0,39</b> | Fosfoetanolamina          | 0,0987 | 0,0858 | <b>1,15</b> |
| CB-08                 | 0,3374 | 0,484  | <b>0,70</b> | Ornitina                  | 0,0139 | 0,0219 | <b>0,63</b> |
| CB-09                 | 0,2227 | 0,6825 | <b>0,33</b> | Oxipurinol                | 0,0962 | 0,092  | <b>1,05</b> |
| CB-15                 | 0,0719 | 0,1418 | <b>0,51</b> | Fenilalanina              | 0,0125 | 0,0263 | <b>0,48</b> |
| CB-16                 | 0,1849 | 0,1653 | <b>1,12</b> | Prolina                   | 0,1165 | 0,1855 | <b>0,63</b> |
| CB-17                 | 0,3837 | 0,3712 | <b>1,03</b> | Propionato                | 0,0041 | 0,0044 | <b>0,93</b> |
| CB-21                 | 0,2669 | 0,2941 | <b>0,91</b> | Piroglutamato             | 0,0162 | 0,0788 | <b>0,21</b> |
| CB-MTX                | 0,8402 | 0,3963 | <b>2,12</b> | S-Adenosil-Homocisteína   | 0,0115 | 0,0103 | <b>1,12</b> |
| CB-MTX2               | 0,2719 | 0,155  | <b>1,75</b> | Sarcosina                 | 0,0088 | 0,0442 | <b>0,20</b> |
| Colato                | 0,003  | 0,0043 | <b>0,70</b> | sn-Glicero-3-fosfocolina  | 0,0632 | 0,2579 | <b>0,25</b> |
| Colina                | 0,0097 | 0,0028 | <b>3,46</b> | Succinato                 | 0,0212 | 0,0244 | <b>0,87</b> |
| Citrato               | 0,0222 | 0,0591 | <b>0,38</b> | Taurina                   | 0,2804 | 0,4102 | <b>0,68</b> |
| Creatina              | 0,0537 | 0,0917 | <b>0,59</b> | Treonina                  | 0,0154 | 0,1007 | <b>0,15</b> |
| Citidina              | 0,0079 | 0,0089 | <b>0,89</b> | trans-4-Hidroxi-L-prolina | 0,0509 | 0,1275 | <b>0,40</b> |
| dCTP                  | 0,0459 | 0,0335 | <b>1,37</b> | Trimetilamina             | 0,0006 | 0,0003 | <b>2,00</b> |
| Etanol                | 0,0068 | 0,0655 | <b>0,10</b> | Tirosina                  | 0,0094 | 0,0264 | <b>0,36</b> |
| Etilenoglicol         | 0,0185 | 0,0321 | <b>0,58</b> | UDP-galactose             | 0,0172 | 0,0234 | <b>0,74</b> |
| Formato               | 0,0237 | 0,0284 | <b>0,83</b> | UDP-glicose               | 0,018  | 0,0637 | <b>0,28</b> |
| Fumarato              | 0,0019 | 0,0042 | <b>0,45</b> | UDP-glucuronato           | 0,0286 | 0,0366 | <b>0,78</b> |



|             |        |        |             |                  |        |        |             |
|-------------|--------|--------|-------------|------------------|--------|--------|-------------|
| Glutamato   | 1,9871 | 3,3903 | <b>0,59</b> | Uridina          | 0,0142 | 0,0132 | <b>1,08</b> |
| Glutamina   | 0,0366 | 0,4564 | <b>0,08</b> | Valina           | 0,0097 | 0,039  | <b>0,25</b> |
| Glutathiona | 0,071  | 0,2462 | <b>0,29</b> | $\beta$ -Alanina | 0,0262 | 0,0337 | <b>0,78</b> |

CB= compostos construídos para quantificação relativa de picos não identificados.

Ao fazer a projeção dos metabólitos intra ou extracelulares de células cultivadas em garrafa de cultura ou bioreator MiniPERM, foi observada extracelularmente a maior diferença entre as culturas (Figura 21). Em outras palavras, neste caso específico, o conteúdo intracelular parece ser mais “estável” a variações no recipiente de cultura em que as células estão contidas, mas mais sensível quando se trata de medir a resposta diferencial de linhagens sensíveis ou resistentes ao MTX (como mostrado no texto). Este foi mais um dado a corroborar a escolha do meio intracelular para este estudo.

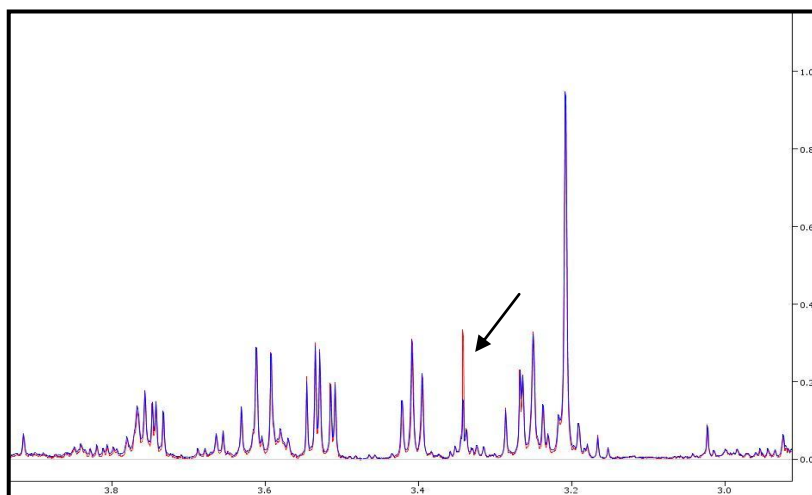


**Figura 21.** Regressão linear a partir dos logaritmos das concentrações de metabólitos intra (esquerda) e extracelulares (direita) quantificados em linhagens REH cultivadas em bioreator MiniPERM ou garrafa de cultura, tratadas com 25nM de MTX por 24h. O menor coeficiente de correlação linear indicou que, nestas condições de tratamento, a maior diferença metabólica entre as linhagens era extracelular, mostrando que o conteúdo intracelular parece ser mais “estável” a variações no recipiente de cultura em que as células estão contidas.



## EXTRAÇÃO VS. REEXTRAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR

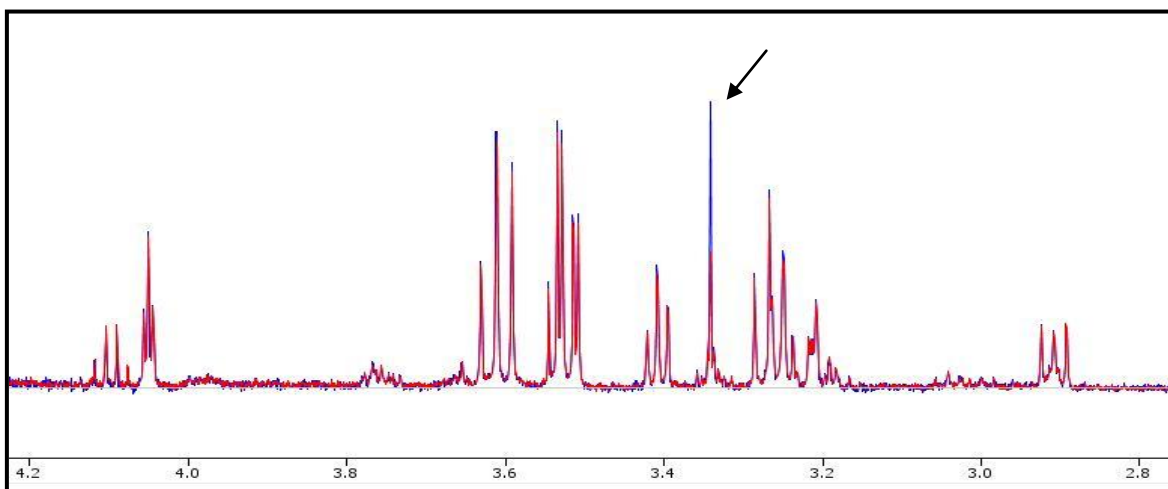
Para determinação das melhores condições para extração do conteúdo intracelular das linhagens, foi testado o efeito de uma dupla extração de 5min cada, segundo o protocolo descrito na seção “Material e Métodos”. Comparada com uma extração simples, a dupla extração pouco acrescentou à concentração obtida dos metabólitos (Figura 22), sendo padronizada para este trabalho, portanto, uma única extração para as amostras.



**Figura 22.** Sobreposição de região espectral de uma amostra submetida à dupla extração (azul) e à extração simples (vermelho). É possível notar a grande semelhança dos espectros. A exceção, apontada pela seta, é o sinal do metanol, que deve ser desconsiderado por se tratar de um solvente externo, resquício de uma liofilização incompleta.

## TEMPO DE SONICAÇÃO

Na sequência, foi realizado um teste sobre o melhor tempo de sonicação do pellet de células. Dois pellets contendo  $1 \times 10^8$  células cada foram sonicados por 1min30seg e 5min. A análise dos conteúdos extraídos mostrou que a diferença de concentração de um mesmo composto medido nos dois tempos era inferior a 10% (Figura 23) – o que significa que a maior parte da extração aconteceu no primeiro minuto da sonicação. Desta forma, foi padronizado um tempo de sonicação intermediário de 3 minutos.



**Figura 23.** Sobreposição de região espectral de uma amostra sonicada por 1min30seg (vermelho) e 5min (azul). A diferença de concentração entre elas foi inferior a 10%. A seta aponta o sinal do metanol.

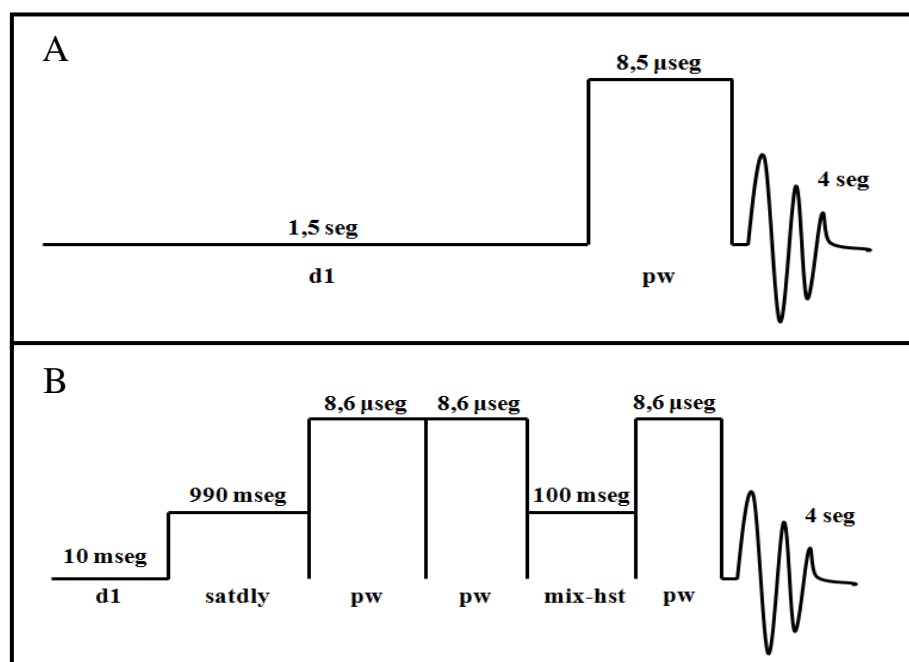
### SEQÜÊNCIA DE PULSOS NO ESPECTRÔMETRO DE RMN

Duas seqüências de pulsos foram testadas: “1D Presat” e “MetNoesy”, ilustradas na Figura 24. A primeira é a mais simples e usual das seqüências de presaturação e a segunda foi recomendada pelos fabricantes do software Chenomx como a mais eficiente em neutralizar a influência do sinal da água nos picos dos demais compostos.

Foram preparadas duas soluções com concentrações conhecidas de glicose e glutamina, sendo que a solução nº 2 era composta pela solução nº 1 + água, na proporção 1:1. Após as medições das duas soluções utilizando as duas freqüências, foram calculadas as porcentagens de acerto para cada metabólito (razão observado/esperado) e a razão entre as porcentagens de acerto dos metabólitos, quantificados nas soluções nº 1 e 2 a partir da mesma seqüência de pulsos. Por meio desta razão, foi possível averiguar se as seqüências de pulso estavam deformando o espectro e levando o software Chenomx a variar sua taxa de acerto (Tabela 9). Quanto menor a oscilação da influência da seqüência de pulsos sobre os picos dos metabólitos, mais próxima de “1” estaria essa razão e mais confiável seria quantificação relativa dos compostos.

Foi constatado que a seqüência de pulsos “1D Presat” suprimiu, na mesma proporção, glicose e glutamina em diferentes concentrações, sendo selecionada para este

estudo. Ainda que não tenha havido uma perfeita quantificação absoluta destes compostos, sua quantificação relativa bastante precisa possibilitou uma análise estatística confiável.



**Figura 24.** Sequências de pulsos “1D Presat” (A) e “MetNoesy” (B).

**Tabela 09.** Concentrações observadas e esperadas para glicose e glutamina presentes em duas soluções. Acima, valores para a sequência de pulsos “1D Presat”; abaixo, para “MetNoesy”.  $R_1$  e  $R_2$  são os percentuais entre os valores observados e os esperados para cada metabólito nas soluções 1 e 2, respectivamente. A sequência “1D Presat” foi a que exerceu menor influência nos picos dos metabólitos, independentemente de suas concentrações. (Valores de concentração expressos em mg/L).

| 1D Presat  | Solução 1 |          |       | Solução 2 |          |       |           |
|------------|-----------|----------|-------|-----------|----------|-------|-----------|
| Metabólito | Obs.      | Esperado | $R_1$ | Obs.      | Esperado | $R_2$ | $R_1/R_2$ |
| Glicose    | 1560,5    | 1995     | 78,2% | 781,9     | 997,5    | 78,4% | 0,997     |
| Glutamina  | 237,1     | 315      | 75,3% | 119,2     | 157,5    | 75,7% | 0,995     |
| MetNoesy   | Solução 1 |          |       | Solução 2 |          |       |           |
| Metabólito | Obs.      | Esperado | $R_1$ | Obs.      | Esperado | $R_2$ | $R_1/R_2$ |
| Glicose    | 1484,0    | 1995     | 75,9% | 663,4     | 997,5    | 66,5% | 1,141     |
| Glutamina  | 255,7     | 315      | 81,2% | 113,8     | 157,5    | 72,2% | 1,125     |

## REFERÊNCIA INTERNA DA AMOSTRA

Testes preliminares em amostras que utilizavam DSS (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico) como padrão interno de concentração apresentaram pior resolução para o pico da referência quando comparados com amostras referenciadas com TSP (ácido 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'-tetra-deutero-propionico ou TMSP-d4).

Esta constatação está de acordo com Shimizu *et al.* [1], que observou uma maior afinidade do DSS por proteínas em relação ao TSP, atribuindo esta propriedade ao fato do primeiro composto apresentar um grupo metileno a mais que o segundo. Esta diferença de composição química promoveria uma maior afinidade do DSS por regiões protéicas hidrofóbicas, o que comprometeria a qualidade de seu sinal no espectro caso a amostra contivesse proteínas. Nas amostras deste trabalho em particular, é plausível supor que a origem da interferência nos picos de DSS sejam proteínas não decantadas na etapa de centrifugação subsequente à sonicação das células.

O TSP apresentou um sinal íntegro e com resolução satisfatória nestas mesmas amostras (sempre inferior a 0,8 Hz), sendo, portanto, padronizada a sua utilização neste estudo.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

[1] Shimizu A, Ikeguchi M, Sugai S. Appropriateness of DSS and TSP as internal references for <sup>1</sup>H-NMR studies of molten globule proteins in aqueous media. *J Biomol NMR*. 1994; 4:859-62.

## APÊNDICE 4

### TESTES DIAGNÓSTICOS PARA AGRUPAMENTOS DE METABÓLITOS

**Tabela 10.** Sensibilidade (S) e especificidade (E) de “agrupamentos” de metabólitos em amostras controles após análises ROC. Em destaque, os agrupamentos que apresentaram mais altos valores para S e E.

| <b>Agrupamentos de Metabólitos</b>      | <b>S</b>   | <b>E</b>    |
|-----------------------------------------|------------|-------------|
| Carnitina e Colato                      | 80         | 92,3        |
| Carnitina e Glicocolato                 | 80         | 92,3        |
| Carnitina e Malato                      | 80         | 92,3        |
| Carnitina e Sarcosina                   | 80         | 92,3        |
| Carnitina e Succinato                   | 80         | 92,3        |
| Colato e Glicocolato                    | 86,7       | 80,8        |
| Colato e Malato                         | 86,7       | 80,8        |
| Colato e Sarcosina                      | 86,7       | 80,8        |
| Colato e Succinato                      | 93,3       | 80,8        |
| Glicocolato e Malato                    | 80         | 80,8        |
| Glicocolato e Sarcosina                 | 80         | 84,6        |
| Glicocolato e Succinato                 | 93,3       | 80,8        |
| Malato e Sarcosina                      | 80         | 84,6        |
| Malato e Succinato                      | 93,3       | 80,8        |
| Sarcosina e Succinato                   | 93,3       | 80,8        |
| Carnitina, Colato e Glicocolato         | 80         | 92,3        |
| Carnitina, Colato e Malato              | 86,7       | 88,5        |
| Carnitina, Colato e Sarcosina           | 93,3       | 92,3        |
| Carnitina, Colato e Succinato           | 93,3       | 88,5        |
| Carnitina, Glicocolato e Malato         | 86,7       | 84,6        |
| Carnitina, Glicocolato e Sarcosina      | 100        | 88,5        |
| Carnitina, Glicocolato e Succinato      | 100        | 84,6        |
| Carnitina, Malato e Sarcosina           | 86,7       | 92,3        |
| Carnitina, Malato e Succinato           | 86,7       | 84,6        |
| <b>Carnitina, Sarcosina e Succinato</b> | <b>100</b> | <b>92,3</b> |

|                                                               |            |             |
|---------------------------------------------------------------|------------|-------------|
| Colato, Glicocolato e Malato                                  | 86,7       | 80,8        |
| Colato, Glicocolato e Sarcosina                               | 100        | 80,8        |
| Colato, Glicocolato e Succinato                               | 93,3       | 88,5        |
| Colato, Malato e Sarcosina                                    | 93,3       | 88,5        |
| Colato, Malato e Succinato                                    | 93,3       | 80,8        |
| Colato, Sarcosina e Succinato                                 | 100        | 88,5        |
| Glicocolato, Malato e Sarcosina                               | 93,3       | 80,8        |
| Glicocolato, Malato e Succinato                               | 93,3       | 84,6        |
| Glicocolato, Sarcosina e Succinato                            | 93,3       | 88,5        |
| Malato, Sarcosina e Succinato                                 | 93,3       | 84,6        |
| Carnitina, Colato, Glicocolato e Malato                       | 86,7       | 88,5        |
| Carnitina, Colato, Glicocolato e Sarcosina                    | 93,3       | 92,3        |
| Carnitina, Colato, Glicocolato e Succinato                    | 93,3       | 92,3        |
| Carnitina, Colato, Malato e Sarcosina                         | 93,3       | 88,5        |
| Carnitina, Colato, Malato e Succinato                         | 93,3       | 88,5        |
| Carnitina, Colato, Sarcosina e Succinato                      | 93,3       | 92,3        |
| Carnitina, Glicocolato, Malato e Sarcosina                    | 100        | 88,5        |
| Carnitina, Glicocolato, Malato e Succinato                    | 100        | 80,8        |
| <b>Carnitina, Glicocolato, Sarcosina e Succinato</b>          | <b>100</b> | <b>92,3</b> |
| <b>Carnitina, Malato, Sarcosina e Succinato</b>               | <b>100</b> | <b>92,3</b> |
| Colato, Glicocolato, Malato, Sarcosina                        | 93,3       | 88,5        |
| Colato, Glicocolato, Malato e Succinato                       | 93,3       | 84,6        |
| Colato, Glicocolato, Sarcosina e Succinato                    | 100        | 88,5        |
| Colato, Malato, Sarcosina e Succinato                         | 93,3       | 88,5        |
| Glicocolato, Malato, Sarcosina e Succinato                    | 100        | 84,6        |
| Carnitina, Colato, Glicocolato, Malato e Sarcosina            | 93,3       | 88,5        |
| Carnitina, Colato, Glicocolato, Malato e Succinato            | 93,3       | 88,5        |
| Carnitina, Colato, Glicocolato, Sarcosina e Succinato         | 93,3       | 92,3        |
| Carnitina, Colato, Malato, Sarcosina e Succinato              | 93,3       | 92,3        |
| <b>Carnitina, Glicocolato, Malato, Sarcosina e Succinato</b>  | <b>100</b> | <b>92,3</b> |
| Colato, Glicocolato, Malato, Sarcosina e Succinato            | 100        | 88,5        |
| Carnitina, Colato, Glicocolato, Malato, Sarcosina e Succinato | 93,3       | 92,3        |

**Tabela 11.** Sensibilidade (S) e especificidade (E) de “agrupamentos” de metabólitos em amostras tratadas com MTX após análises ROC. Em destaque, os agrupamentos que apresentaram mais altos valores para S e E.

| <b>Agrupamentos de Metabólitos</b>                             | <b>S</b>   | <b>E</b>    |
|----------------------------------------------------------------|------------|-------------|
| CB-MTX e Fosfocolina                                           | 80         | 81,5        |
| CB-MTX e Glicocolato                                           | 80         | 81,5        |
| CB-MTX e Sarcosina                                             | 86,7       | 77,8        |
| CB-MTX e Succinato                                             | 80         | 85,2        |
| Fosfocolina e Glicocolato                                      | 86,7       | 74,1        |
| Fosfocolina e sarcosina                                        | 86,7       | 77,8        |
| Fosfocolina e Succinato                                        | 80         | 85,2        |
| Glicocolato e Sarcosina                                        | 86,7       | 77,8        |
| Glicocolato e Succinato                                        | 80         | 85,2        |
| Sarcosina e Succinato                                          | 80         | 85,2        |
| CB-MTX, Fosfocolina e Glicocolato                              | 100        | 81,5        |
| CB-MTX, Fosfocolina e Sarcosina                                | 86,7       | 77,8        |
| CB-MTX, Fosfocolina e Succinato                                | 80         | 92,6        |
| CB-MTX, Glicocolato e Sarcosina                                | 86,7       | 92,6        |
| CB-MTX, Glicocolato e Succinato                                | 80         | 92,6        |
| CB-MTX, Sarcosina e Succinato                                  | 86,7       | 85,2        |
| Fosfocolina, Glicocolato e Sarcosina                           | 86,7       | 77,8        |
| Fosfocolina, Glicocolato e Succinato                           | 93,3       | 88,9        |
| Fosfocolina, Sarcosina e Succinato                             | 93,3       | 77,8        |
| Glicocolato, Sarcosina e Succinato                             | 86,7       | 88,9        |
| CB-MTX, Fosfocolina, Glicocolato e Sarcosina                   | 86,7       | 92,6        |
| CB-MTX, Fosfocolina, Glicocolato e Succinato                   | 100        | 81,5        |
| CB-MTX, Fosfocolina, Sarcosina e Succinato                     | 86,7       | 85,2        |
| <b>CB-MTX, Glicocolato, Sarcosina e Succinato</b>              | <b>100</b> | <b>85,2</b> |
| Fosfocolina, Glicocolato, Sarcosina e Succinato                | 86,7       | 96,3        |
| <b>CB-MTX, Fosfocolina, Glicocolato, Sarcosina e Succinato</b> | <b>100</b> | <b>85,2</b> |

## APÊNDICE 5

### **SEQÜÊNCIA DE PASSOS NO ESPECTRÔMETRO DE RMN E NA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NO SOFTWARE CHENOMX; EXPLANAÇÃO SOBRE ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS E ROC.**

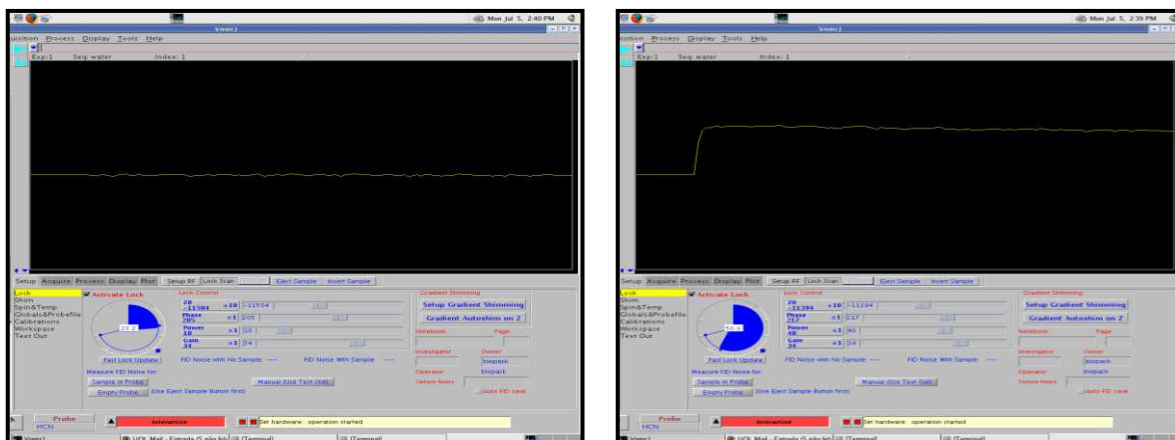
**NOTA:** Uma vez que este projeto foi um dos pioneiros em nosso laboratório a congregar técnicas de cultura celular, ressonância magnética nuclear, análises quimiométricas e ROC, achamos por bem discriminar ao máximo os passos e ajustes que foram feitos até aqui, de modo a beneficiar novos estudos que venham a percorrer o mesmo caminho. Ressaltamos que tudo que o foi julgado pertinente e digno de nota acerca dos tópicos que serão detalhados encontra-se na seção “Material e Métodos” ou “Resultados e Discussões”, de modo que a leitura deste apêndice não é imprescindível para a plena compreensão deste trabalho.

#### **AJUSTES NO ESPECTRÔMETRO DE RMN**

Inserida a amostra no espectrômetro, ajustamos a impedância do *probe* (sonda). Este processo é denominado *tunning*, ou sintonia. Um *probe* submetido a um *tunning* mal feito irá refletir a maior parte da energia aplicada, de modo que, o que deveria ser um pulso de 90°, pode não passar, por exemplo, de um pulso de 50° [1]. Ao fazermos coincidir a frequência de pulsação do aparelho com a frequência de ressonância do próton do hidrogênio, buscamos garantir a repetibilidade do experimento. Todas as etapas de aquisição de dados relatadas a seguir foram feitas com o auxílio do software VnmrJ (Varian NMR System), que controla o espectrômetro Varian Inova de 500 MHz do LNBio - CNPEM.

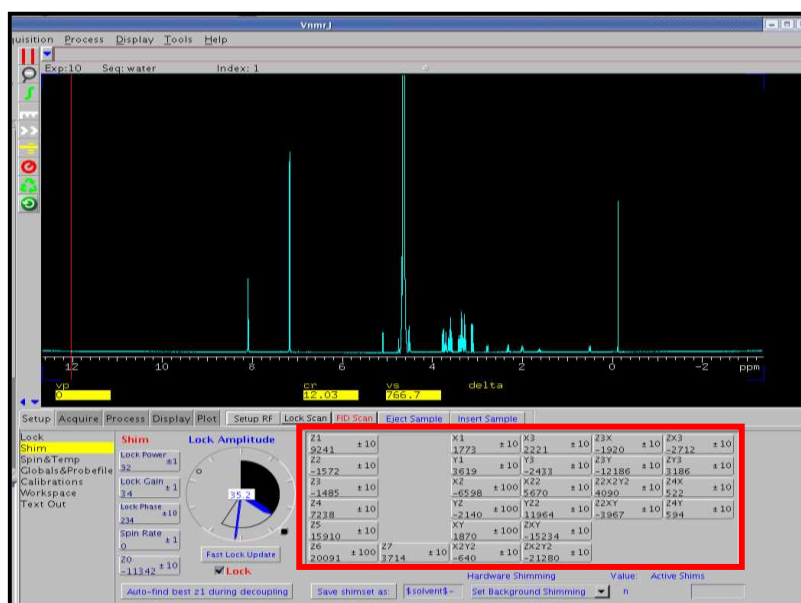
Primeiramente, ajustamos manualmente o *locking* tendo por referência a resposta do sinal de deutério proveniente da água deuterada (D<sub>2</sub>O) (Figura 25). O *locking* é um mecanismo de bobinas do aparelho de ressonância magnética que tentará compensar eventuais flutuações na geração de seu campo magnético, deixando-o o mais estável possível. Na sequência, procedemos ao ajuste do *shimming*, uma espécie de compensação do campo magnético na região da amostra. Nesta fase, procura-se aprimorar a resolução do





**Figura 25.** Exemplo de ajuste de *locking*. A linha amarela sobre a tela preta representa a resposta do deutério. À esquerda, antes do ajuste; à direita, *locking* ajustado.

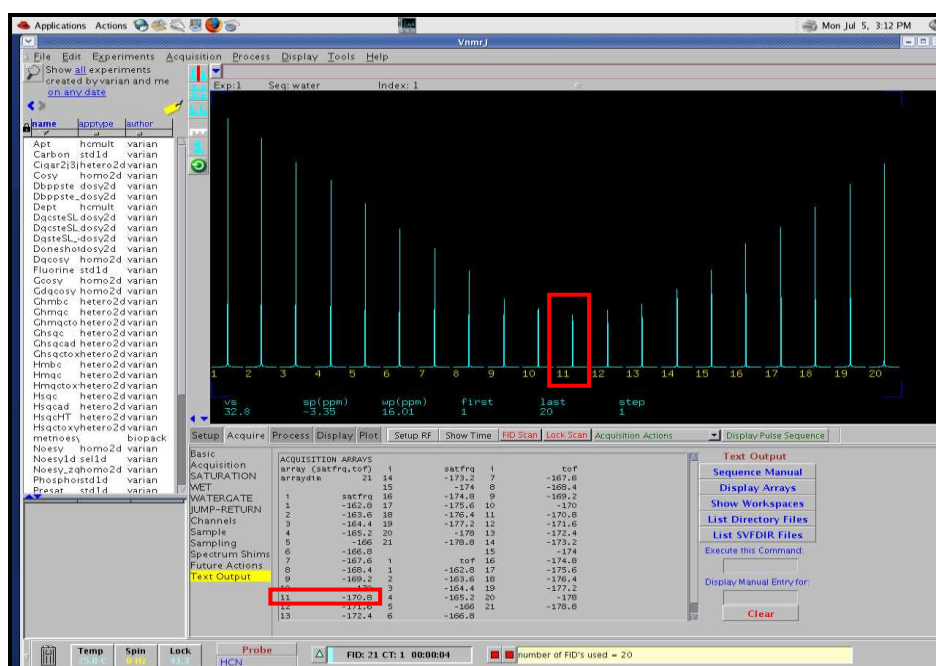
signal ao otimizar a homogeneidade do campo magnético por ajustes nos eixos espaciais (X, Y e Z) da amostra dentro do *probe*, de modo que qualquer porção da amostra, a qualquer momento, experimente o mesmo campo magnético que as demais porções. O ajuste do *shimming* é feito parte manual, parte automaticamente; é uma etapa fundamental – e dispendiosa – que envolve regulagens sutis nas variações dos eixos espaciais da amostra (Figura 26).



**Figura 26.** Ajuste de *shimming*. Screenshot do software VnmrJ. Cada pequena caixa dentro do retângulo vermelho controla um dos eixos espaciais isoladamente (X, Y e Z) ou nuances de suas combinações simultâneas. O *shimming* objetiva a máxima homogeneização do campo magnético a que está submetida a amostra.

A supressão do sinal da água é necessária uma vez que este pode comprometer seriamente o espectro ao seu redor [2]. Ademais, utilizamos uma série de experimentos concatenados, ou em série, para determinar a duração do pulso de excitação, denominado pulso de 90 graus ( $pw$ ), que é utilizado pelo equipamento para excitar os núcleos de hidrogênio na amostra. Buscamos nesses experimentos maximizar o sinal ressonante de resposta. Uma vez determinada a duração do pulso, procedemos com a etapa de supressão (ou saturação) do sinal da água. Ainda que nossa amostra estivesse diluída em  $D_2O$ , sempre há um sinal residual de água, proveniente de um resquício não sublimado na liofilização da amostra ou da própria difusão do vapor d'água atmosférico.

Para determinarmos a frequência de saturação da água na sequência de pulsos “1Dpresat”, realizamos uma série de experimentos de saturação concatenados, em que testamos várias frequências até determinarmos aquela para a qual o sinal da água era o menor possível (Figura 27). Esta era a frequência de saturação da água mais apropriada para o nosso experimento.

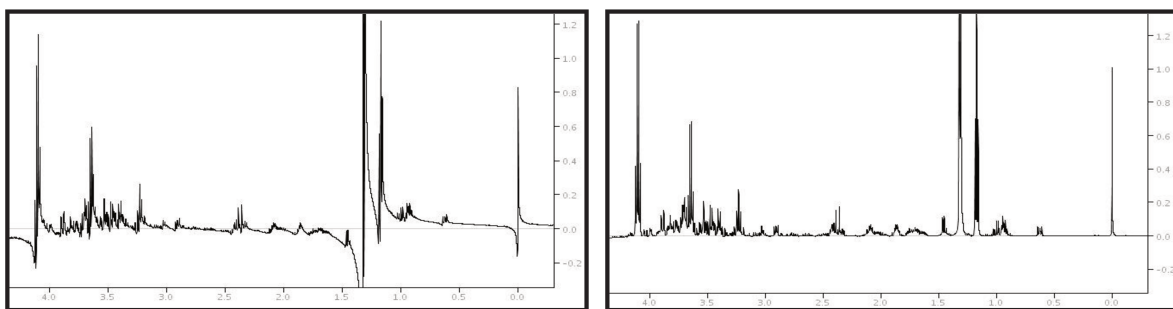


**Figura 27.** Determinação da frequência de saturação da água para os experimentos “1Dpresat”. Cada um dos 20 picos numerados observados na tela escura representa o sinal da água para uma frequência diferente. A frequência de saturação ideal será aquela na qual o sinal da água for o menor possível. Neste caso, a frequência de número 11 (retângulo vermelho superior) foi escolhida para este fim. No retângulo vermelho inferior, o seu valor correspondente em MHz.

## TRATAMENTOS DOS DADOS NO SOFTWARE CHENOMX

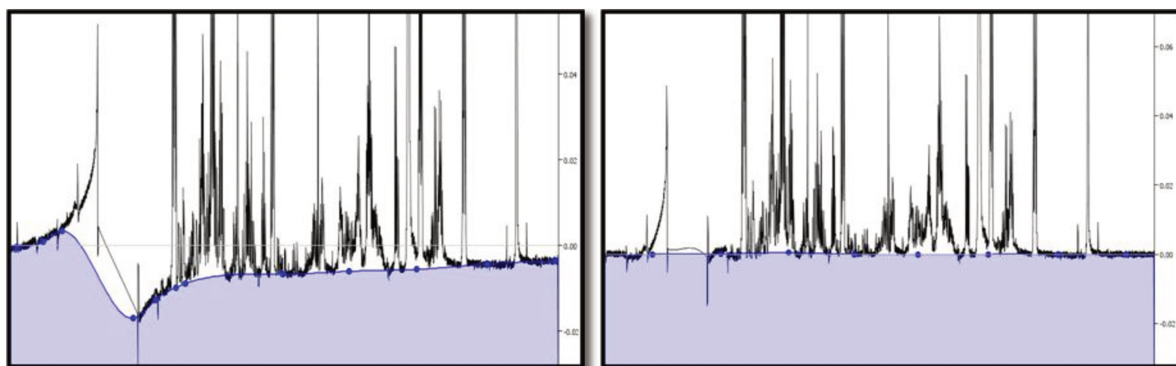
### *O Processamento (“Processing”)*

Uma vez adquirido o espectro de RMN, passamos para o tratamento dos dados no software Chenomx NMR Suite (versão 7.1; Chenomx Inc., Edmonton, Canadá). Semelhantemente à aquisição dos dados, esta fase de tratamento também requereu alguns ajustes iniciais para a melhor conversão do sinal de decaimento temporal em um espectro de frequências. Primeiramente, observamos se a linha de base do espectro estava achatada e simetricamente disposta nas bases dos picos. Em caso negativo, procedemos ao *ajuste de fase* do espectro (Figura 28).



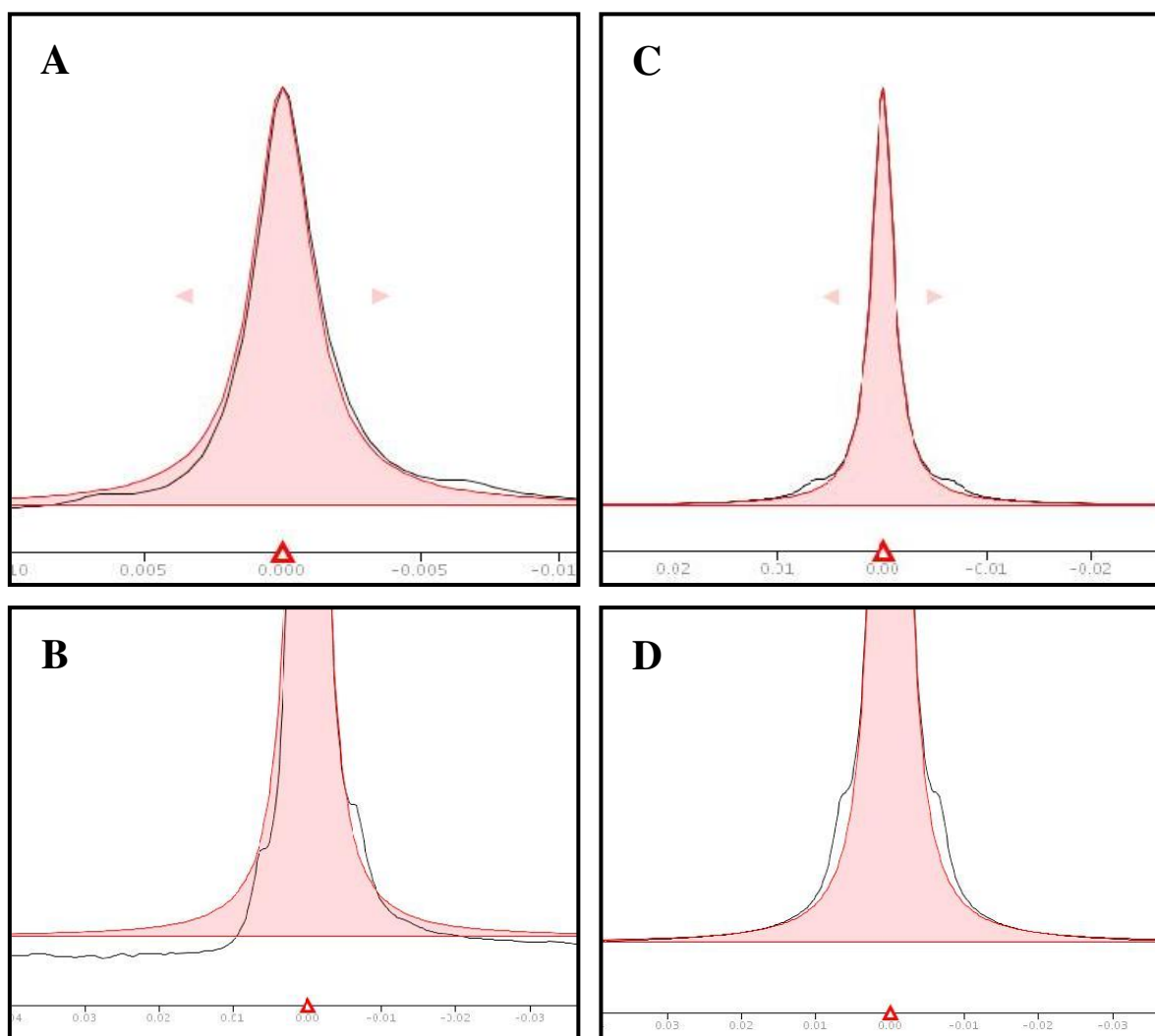
**Figura 28.** Ajuste de fase. À esquerda: fase distorcida (base dos picos assimétrica). À direita: o mesmo espectro após o ajuste.

Ajustada a *fase* do espectro, foi necessário tornar a sua linha de base o mais próximo possível de uma reta horizontal, sem “invadir” quaisquer picos do espectro, uma vez que a quantificação dos compostos dependia desta premissa. A *correção da linha de base* evitou eventuais sub ou superestimativas das concentrações dos compostos (Figura 29).



**Figura 29.** Correção da linha de base. À esquerda, linha de base (azul) distorcida. À direita, a mesma região do espectro com a linha de base corrigida.

Na sequência, procedemos à *deconvolução da referência*, isto é, ajustamos o sinal da referência de nosso espectro (no caso, de TSP) de modo a aprimorar sua resolução e simetria (Figura 30). A partir deste momento, o sinal ajustado do TSP (cuja concentração é conhecida) passou a ser de fato a referência na quantificação dos outros compostos. Um passo opcional que facilitou a visualização e o tratamento do espectro foi a *deleção da água* – uma ferramenta automática que suprimiu a região na qual estava localizado o sinal da água (Figura 31). O inconveniente desta ferramenta foi que sinais contíguos ao da água foram perdidos.



**Figura 30.** Deconvolução da referência. (A) Pico do TSP antes da deconvolução; atentar para a incongruência entre o sinal do espectro (linha preta) e a informação da biblioteca do Chenomx (vermelho). (B) Alterando-se as dimensões do espectro, esta disparidade torna-se mais evidente. (C) Pico do TSP após a deconvolução e o detalhe da sua base ajustada (D).



**Figura 31.** Deleção da água. À esquerda, espectro antes da deleção. O sinal da água é o grande traço vertical central. Todos os outros sinais do espectro estão concentrados no retângulo vermelho. À direita, espectro após a deleção da água. Em destaque no círculo azul, a região espectral onde estava o sinal da água.

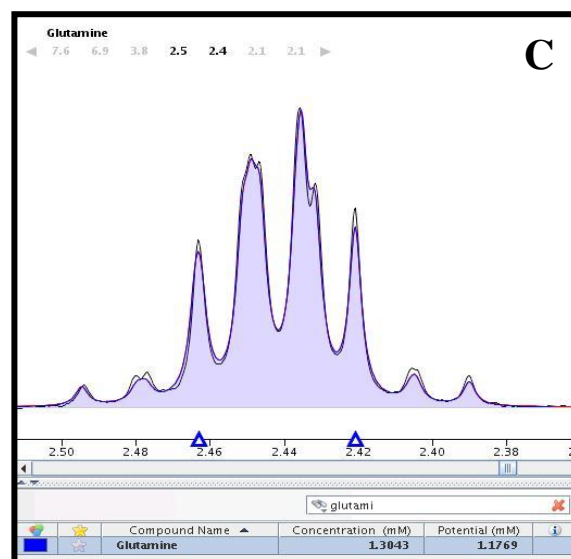
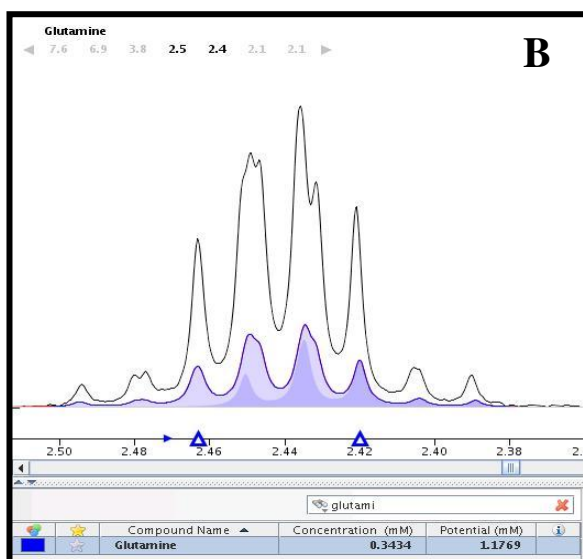
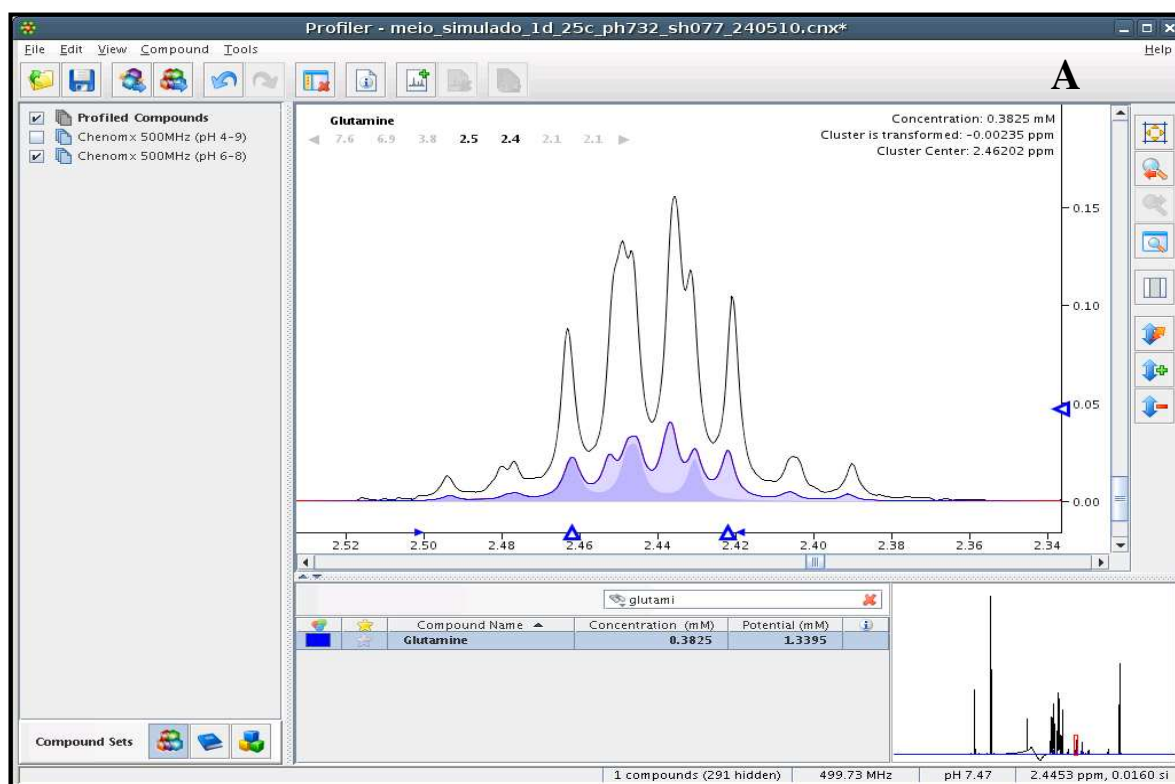
### ***O “Profiling”, ou determinação do perfil de moléculas na amostra***

Executado o pré-tratamento (“*processing*”) das amostras, passamos para a análise qualitativa e quantitativa dos seus metabólitos. Esta etapa foi denominada “*profiling*”, pois se tratou justamente de determinar o *perfil metabólico* das amostras. Escolhida a biblioteca de compostos com a qual se irá trabalhar (uma para amostras com pH entre 4-9 e outra entre 6-8), procuramos *encaixar* (usualmente denominado “*fitar*” – do verbo “to fit”, encaixar, em inglês), um a um, os espectros dos metabólitos da biblioteca de compostos ao nosso espectro de RMN. Ao ajustarmos o espectro de um metabólito para “*fitá-lo*” adequadamente, o software calculava de modo automático a sua concentração na amostra a partir da área do pico de nossa referência interna (TSP), cuja concentração era conhecida (Figura 32).

### **ANÁLISE MULTIVARIADA (PCA E PLS-DA)**

Com o auxílio do software Pirouette 4.0 (Infometrix Inc., Washington, EUA), foi feita a segregação não supervisionada das diferentes amostras utilizando a técnica de *análise de componentes principais* (PCA, “*principal component analysis*”). Esta técnica é baseada no reconhecimento de padrões e expressa os dados de maneira a realçar suas similaridades e diferenças.

O objetivo principal da PCA é a obtenção de um pequeno número de combinações



**Figura 32.** O “Profiling” – fitando o aminoácido glutamina. (A) Screenshot da seção de *profiling* do software Chenomx. (B) Detalhe do *fitting* de um dos sinais da glutamina. O sinal em preto pertence ao espectro de nossa amostra, enquanto que em azul está a informação da biblioteca de metabólitos do Chenomx para a glutamina nesta região do espectro. (C) Terminado o ajuste, com o encaixe perfeito da linha do espectro com os dados do software para o metabólito. Neste momento, é possível saber a concentração do aminoácido em nossa amostra (tarja azul no rodapé da figura). Neste caso, a amostra contém 1,3043 mmol/L de glutamina.

lineares (“componentes principais”) de um conjunto de variáveis, que retenham o máximo possível da informação contida nas variáveis originais. Desta forma, apenas um pequeno número de componentes pode ser usado, ao invés das (inúmeras) variáveis originais, nas análises de regressões, análises de agrupamentos, etc. Os Componentes Principais (PC’s) são extraídos na ordem do mais explicativo para o menos explicativo. Teoricamente, o número de componentes principais é sempre igual ao número de variáveis. Entretanto, algumas poucas PC’s são responsáveis por grande parte da explicação total. A principal vantagem do método, portanto, é reduzir o número de dimensões sem que ocorra perda significativa de informação [3].

A análise de PCA, no entanto, evidencia apenas quais variáveis são as mais expressivas no universo total da variação. Para se descobrir quais variáveis contribuem para uma parcela específica da variação total (neste trabalho, quais metabólitos estariam relacionados à sensibilidade ou resistência ao MTX), é preciso fazer uma análise supervisionada: a *análise discriminante por mínimos quadrados parciais* (PLS-DA, “*partial least squares discriminant analysis*”). O PLS-DA é uma técnica para redução de dimensão, relacionada à análise de componentes principais e à correlação canônica, no qual não existe a distinção entre variável independente e dependente, mas apenas dois conjuntos de variáveis entre os quais se busca a máxima correlação.

A partir de uma ou de muitas variáveis quantitativas (concentrações dos metabólitos) e uma variável de classificação (resistência ou sensibilidade ao MTX), o PLS-DA calcula as variáveis canônicas (combinações lineares de variáveis quantitativas) que resumem a variação dentro de cada grupo classificatório (“sensível” ou “resistente”), como na análise de componentes principais. Estas combinações lineares são organizadas de modo a evidenciar as diferenças entre as classes classificatórias.

Após a análise multivariada por PLS-DA, foi possível chegar a um modelo otimizado (com seleção de variáveis) que apresentou a melhor capacidade de modelagem e de predição de amostras para cada uma das classes. As variáveis que restaram corresponderam aos metabólitos que mais estavam correlacionados a uma ou outra categoria na qual tínhamos interesse.

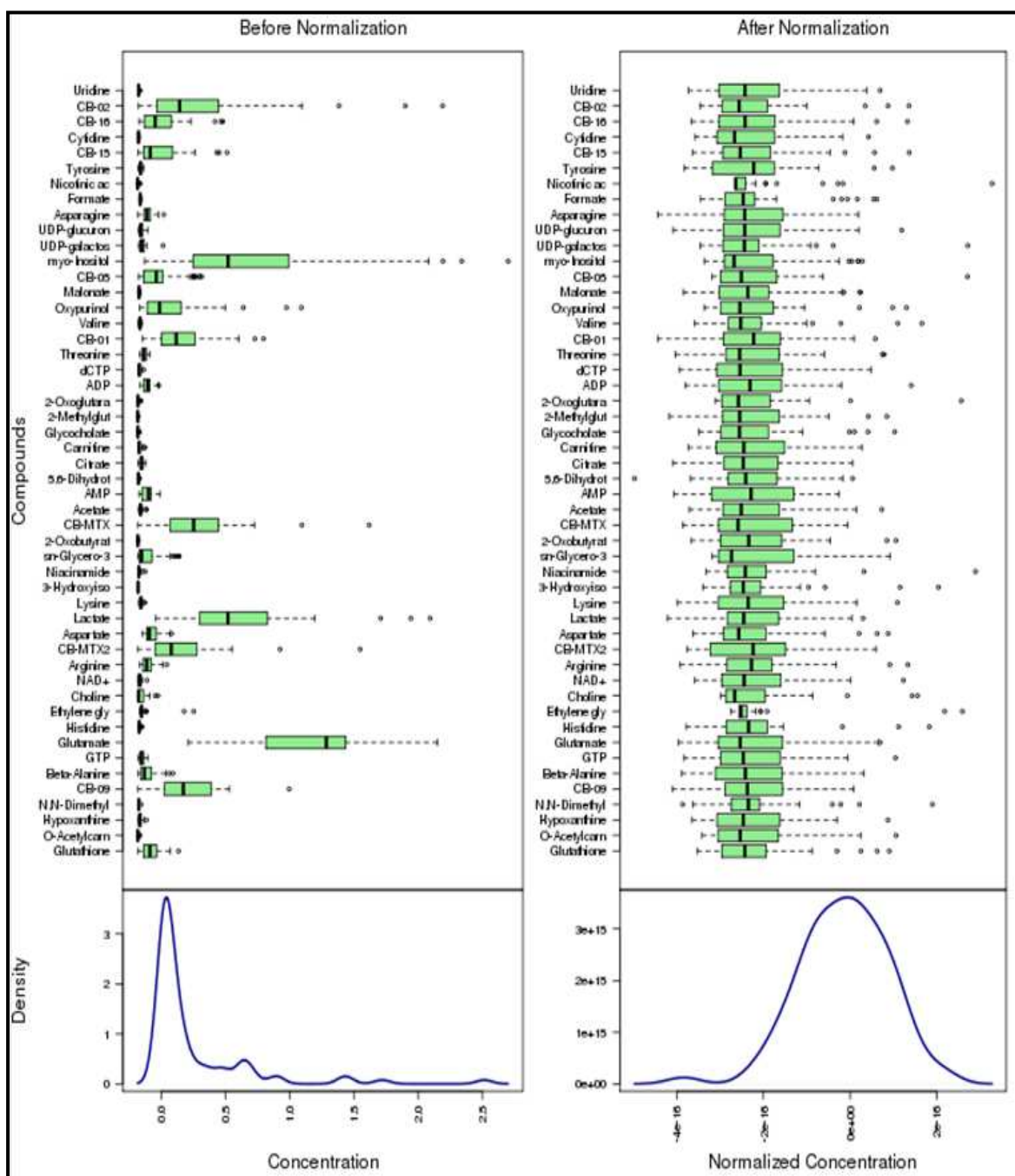


No entanto, antes de realizarmos a análise por PLS-DA, alguns pré-tratamentos tiveram de ser feitos: pelo fato de os valores de concentrações de metabólitos variarem entre si em grande magnitude (p. ex., enquanto as concentrações de 2-metilglutarato oscilavam em torno de 30 nmol/L, as de glutamato variavam entre 0,5 – 4,7  $\mu$ mol/L), os valores de concentrações foram *autoescalados*. Por esta técnica de *pré-processamento*, cada valor de variável para uma amostra específica foi substituída pela diferença entre ele e a média de todos os valores amostrais para aquela variável, seguido da divisão pela variância desse conjunto de dados. Este tipo de pré-processamento tornou os dados *padronizados* e as variáveis, comparáveis entre si.

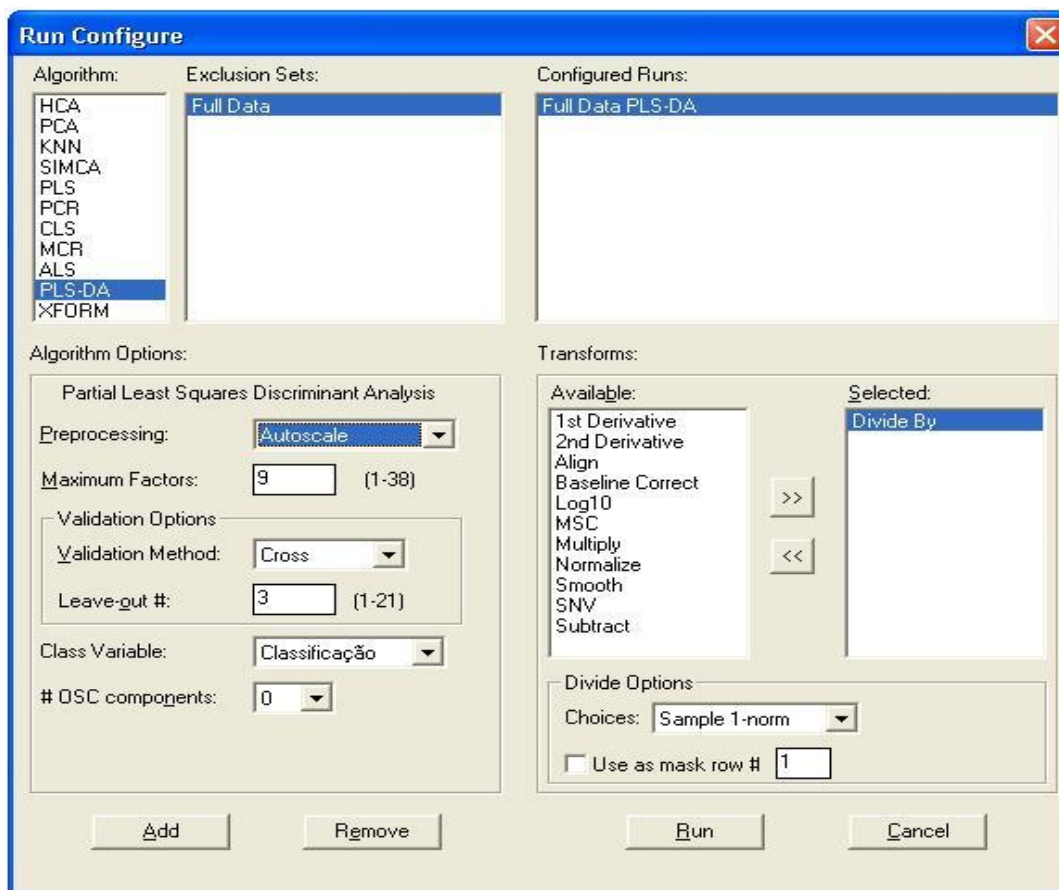
Além disso, nossas amostras eram compostas pelo extrato celular de  $10^8$  células, sendo estas sonicadas e ressuspensas (após liofilização) em um mesmo volume de solvente. Desta forma, linhagens de maior volume celular produziram espectros com sinais mais intensos (para todos os metabólitos) do que linhagens de menor volume celular, pois extratos oriundos das primeiras culminavam em amostras mais concentradas que os das segundas. Para anular essa variação, as amostras foram *transformadas* pela *normalização pela área* (ou “divisão pela 1ª normalização da amostra”). Neste tipo de normalização, cada valor de variável de uma amostra foi dividido pela somatória dos valores de todas as variáveis daquela mesma amostra. Este tipo de transformação *normalizou* as amostras e as tornou comparáveis entre si. A Figura 33 ilustra a diferença entre o conjunto de dados originais (sem pré-tratamento algum) e após o autoescalamamento e a normalização pela área.

Para se verificar a eficiência de um modelo em classificar e fazer previsões procura-se reservar parte do número de amostras para a construção do modelo (“conjunto de calibração”) e parte para a sua validação (“conjunto teste”). Entretanto, nem sempre isto é possível. Quando um grande número amostral não está disponível, fica inviável a alocação de amostras num conjunto teste exclusivo para a validação do modelo. A alternativa é realizar a denominada “validação cruzada” (“*cross validation*” ou apenas “*cross*”), na qual uma mesma amostra é hora utilizada na construção do modelo, ora na sua validação. Usualmente realizam-se sucessivas validações cruzadas com até aprox. 1/3 das amostras totais. A Figura 34 traz a janela de comando do software Pirouette onde se realizam todos os ajustes de pré-tratamento, transformação e validação cruzada.





**Figura 33.** Comparação entre variáveis originais e após pré-processamento (autoescalamento) e normalização pela área em amostras tratadas com MTX. À esquerda, distribuição de 50 variáveis com diferentes magnitudes. À direita, as mesmas variáveis autoescaladas e divididas pela primeira normalização da amostra. Estes pré-tratamentos possibilitaram que os metabólitos se tornassem comparáveis entre si e que vieses metodológicos fossem superados. Gráficos gerado na plataforma online MetaboAnalyst.



**Figura 34.** Screenshot da janela de comando do software Pirouette. No canto superior esquerdo é possível ver a análise selecionada a ser realizada (“PLS-DA”), tendo por pré-processamento o *autoescalamento* (“Autoscale”, na figura) e por transformação a *normalização pela área* (“Sample 1-norm”). Pode-se também verificar o tipo de validação do modelo que será empregada, no caso, a *validação cruzada* (“Cross”) com 3 amostras (“3”) sendo deixadas de fora da construção do modelo.

Alguns parâmetros de especial importância surgem da validação cruzada. Um deles é o erro padrão de validação (SEV). O SEV é obtido do seguinte modo: 1) remove-se uma ou mais amostras do conjunto de calibração e constrói-se o modelo; 2) usa-se o novo modelo para prever os dados removidos; 3) calcula-se o erro de previsão; 4) calcula-se a soma dos quadrados dos erros de previsão (PRESS) ou a sua raiz quadrada (SEV), que é, na realidade, um desvio padrão. O gráfico de SEV em função das componentes principais (PC’s) indica o número mais adequado de fatores, no qual o valor de SEV seja mínimo. Em outras palavras, o número ideal de variáveis latentes (LV’s, sinônimo de PC’s) será aquele para o qual o erro padrão de validação for mínimo – e a performance do modelo,

portanto, for máxima. Já o erro padrão de calibração (SEC) é a raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias entre as amostras e a reta gerada no modelo. O valor de SEC sempre será menor que o de SEV, ainda que estes valores não devam diferir muito.

Outros parâmetros importantes são os coeficientes de correlação ( $r$ ). O coeficiente de correlação de calibração ( $r_{Cal}$ ) é o coeficiente de correlação linear obtido na construção (calibração) do modelo. Ele indica o quanto um modelo está *superajustado* às amostras usadas na calibração. Em geral, modelos *superajustados* apresentam uma capacidade de predição comprometida. O coeficiente de correlação de validação ( $r_{Val}$ ), por sua vez, é o coeficiente de correlação obtido na regressão linear das amostras de calibração + amostras deixadas de fora do conjunto de calibração para a validação cruzada. Espera-se que  $r_{Val}$  seja um pouco menor que  $r_{Cal}$ , sendo ambos o mais próximo possível de 1. Coeficientes negativos,  $r_{Val} > r_{Cal}$  ou  $r_{Cal} \gg r_{Val}$  são indícios de que o modelo deixa a desejar.

O melhor modelo foi considerado aquele que, com um menor número de variáveis, conseguiu alocar as amostras em suas respectivas classes o mais corretamente possível, sendo mantida, durante este processo, a robustez do modelo (i.e., sem diminuição significativa de  $r_{Cal}$  e  $r_{Val}$  nas sucessivas seleções de variáveis e aumento do SEV nas validações cruzadas).

Uma vez construídos os modelos no software Pirouette, testes de permutação (*bootstrapping*) foram realizados com auxílio do software PLS ToolBox (Eigenvector Research Inc., Manson, Washington, EUA). Nesta permutação, o software construiu um modelo e realizou um *cross* (para 6, 12 e 18 amostras) em 1.000 modelos “permutados” nos quais a variável canônica de classificação (“sensível” ou “resistente”) fora aleatorizada. Os SEV’s destas 1.000 permutações foram comparados com a média dos SEV’s de 1.000 modelos “reais” nos quais apenas a ordem das amostras havia sido aleatorizada, como estratégia para retirar a influência de eventuais amostras atípicas sobre o modelo final. O nível de significância estatística do modelo construído no software Pirouette com relação a um modelo originado ao acaso (simulado pelos modelos “permutados”) pode ser expresso pelo número de modelos “permutados” que apresentaram SEV menor do que a média dos SEV’s das 1.000 permutações “reais”, dividido por 1.000. Por exemplo, se isto ocorreu em 5 dos 1.000 modelos “permutados”, a probabilidade do modelo construído ter sido gerado ao acaso é de 0,5% ( $p=0,005$ ).

## ANÁLISE ROC

O desenvolvimento de sistemas, métodos ou testes que envolvam detecção, diagnóstico ou previsão, exige a validação de resultados de modo a quantificar seu poder discriminativo e averiguar sua eficiência [4]. No entanto, a simples quantificação de acertos num grupo teste não necessariamente refletirá o quão eficiente um sistema é, pois essa quantificação dependerá fundamentalmente da qualidade e da distribuição dos dados neste grupo de teste [4].

Quando um novo teste diagnóstico é desenvolvido em Medicina, é necessário avaliar de forma objetiva o seu poder discriminativo em relação à doença ou condição a que se destina detectar [5]. Essa avaliação é fundamental, pois o parâmetro de desempenho mais comumente utilizado, a porcentagem de testes cuja discriminação foi realizada corretamente – a chamada “acurácia” –, não é suficiente para descrever por completo como o método de decisão se comporta em relação aos falso-positivos (pacientes que não têm a condição patológica, mas que o método de decisão aponta como tendo), e aos falso-negativos (o oposto do anterior). Evidentemente, um teste com boa acurácia, mas que produz um número inaceitável de falso-positivos ou falso-negativos pode causar sérios problemas [4]. Estes valores podem ser visualizados em uma tabela de contingência (também denominada “matriz de confusão”) (Figura 35).

|                                               |                  | <b>Valor Verdadeiro</b><br>(Confirmado por Análise Padrão) |                                    |
|-----------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                               |                  | <b>Positivos</b>                                           | <b>Negativos</b>                   |
| <b>Valor Previsto</b><br>(Predito pelo Teste) | <b>Positivos</b> | <b>VP</b><br>Verdadeiros Positivos                         | <b>FP</b><br>Falso-Positivos       |
|                                               | <b>Negativos</b> | <b>FN</b><br>Falso-Negativos                               | <b>VN</b><br>Verdadeiros Negativos |

**Figura 35.** Exemplo de uma matriz de confusão (“tabela de contingência”).

Os resultados previstos pelo método diagnóstico são comparados com os resultados reais, obtidos por outro método mais preciso, e a partir da matriz de contingência alguns parâmetros (dentre vários) podem ser obtidos:

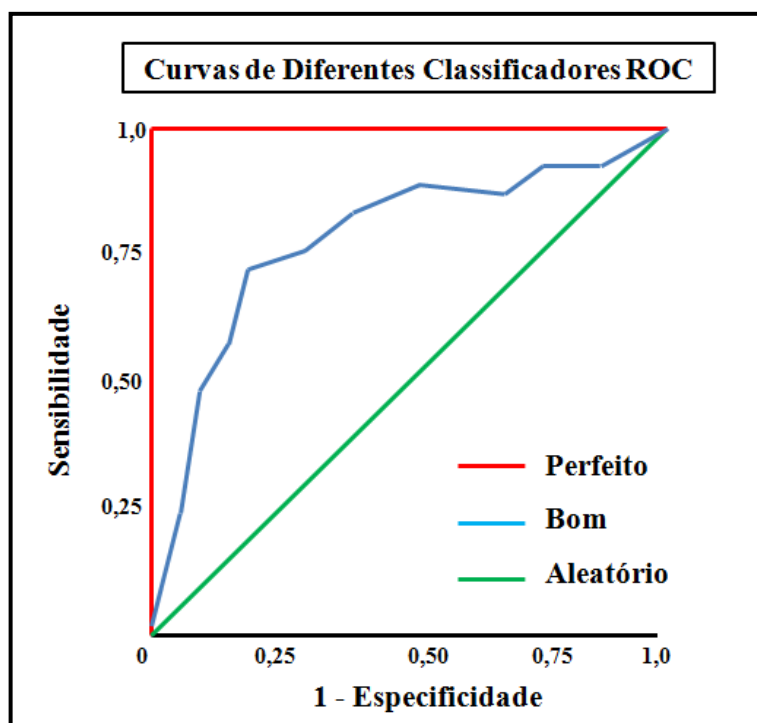
- **Acurácia:** a proporção de predições corretas (soma de positivos verdadeiros e negativos verdadeiros)  $\rightarrow (VP + VN) / (P + N)$ .
- **Sensibilidade:** a proporção de positivos verdadeiros, ou seja, a medida da capacidade do método de decisão de prever a condição patológica para aqueles casos que realmente a apresentam  $\rightarrow VP / (VP + FN)$ .
- **Especificidade:** a proporção de negativos verdadeiros, ou seja, a medida da capacidade do método de decisão de apontar ausência da condição para aqueles casos que realmente não a têm  $\rightarrow VN / (VN + FP)$ .
- **Preditividade positiva (ou precisão):** a proporção de positivos verdadeiros em relação a todas as predições positivas  $\rightarrow VP / (VP + FP)$ .
- **Preditividade negativa:** a proporção de negativos verdadeiros em relação a todas as predições negativas  $\rightarrow VN / (VN + FN)$ .
- **Índice de Youden:** a soma de sensibilidade e especificidade, subtraído de 1  $\rightarrow$  (sensibilidade + especificidade) – 1.
- **F-measure:** computa uma média harmônica da informação contida na sensibilidade e na precisão. Varia entre 0 e 1, sendo que valores mais próximos de 1 indicam uma melhor qualidade de classificação  $\rightarrow (2 \times \text{sensibilidade} \times \text{precisão}) / (\text{sensibilidade} + \text{precisão})$ .

A análise ROC (“Receiver Operating Characteristics”) é técnica que permite visualizar, organizar e selecionar classificadores baseando-nos em suas performances [6], cujo emprego, inicialmente na área militar, foi sendo estendido a outras áreas, incluindo a visualização e análise de comportamento de sistemas diagnósticos [7]. Zou *et al.* [8] traz uma extensa literatura médica dedicada a testes diagnósticos embasados em análise ROC.

Uma vez que o resultado de sistemas de classificação em classes geralmente é contínuo, ou seja, produz-se um valor situado dentro de um determinado intervalo contínuo, como [0,1], é necessário definir um ponto de corte, ou um *limiar de decisão* (“cut-off”),

para se classificar e contabilizar o número de predições positivas e negativas (diagnósticos verdadeiros e falsos no caso de uma patologia). Como este limiar pode ser selecionado arbitrariamente, a melhor alternativa para se comparar o desempenho de diversos sistemas é estudar o efeito de seleção de diversos *cut-offs* sobre a saída dos dados. Para cada ponto de corte são calculados valores de sensibilidade e especificidade, que podem então ser dispostos em um gráfico denominado *curva ROC*, o qual traz os valores de sensibilidade no eixo das ordenadas e nas abscissas o complemento da especificidade, ou seja, o valor “1-especificidade” [9] (Figura 36).

Um classificador perfeito apresenta uma linha horizontal no topo do gráfico. A linha diagonal indica uma classificação aleatória. Na prática, curvas consideradas boas estão entre a linha diagonal e a linha perfeita, sendo que, quanto maior a distância da curva à linha diagonal de aleatoriedade, mais eficiente é o sistema como um todo. Uma medida padrão para a comparação de sistemas é a *área sob a curva* (AUC – “*area under the curve*”), obtida por integração. Teoricamente, quanto maior a AUC, melhor o sistema de um modo geral [9].



**Figura 36.** Exemplos de curvas ROC, com a respectiva qualidade de cada classificador.

Usualmente, é classificado como “perfeito” o teste com  $AUC=1$ ; “excelente” aquele com  $0,9 \leq AUC < 1$ ; “bom” o que apresenta  $0,8 \leq AUC < 0,9$ ; “razoável” o que tem  $0,7 \leq AUC < 0,8$ ; e “ruim” aquele com  $AUC < 0,7$ , uma vez que sua área não é estatisticamente diferente daquela obtida por um teste ao acaso (com  $AUC=0,5$ ). O melhor limiar de decisão foi tido como o ponto da curva que mais se aproximou da coordenada (0,1), ou seja, o valor de corte para o qual a combinação entre sensibilidade e especificidade do teste foi máxima.

As análises ROC iniciais foram feitas com os valores de concentração dos metabólitos individualmente, obtidos a partir da construção do modelo de classificação. Também foram feitas análises ROC para “agrupamentos” de metabólitos, ou seja, metabólitos considerados simultaneamente.

Nestas análises de “agrupamentos” de metabólitos, os valores reais de concentração de cada metabólito foram confrontados com o seu respectivo melhor *cut-off* individual, ganhando um valor dinâmico “0” caso estivessem em menor concentração que o *cut-off* de metabólitos relacionados à resistência ou acima do *cut-off* de metabólitos relacionados à sensibilidade, e “1” para o oposto destes casos. Para cada amostra, foram multiplicados estes “valores dinâmicos” pelos respectivos *F-measure* de cada metabólito considerado, sendo então somados estes produtos para a obtenção de um índice final. A multiplicação de um “valor dinâmico” pelo valor de *F-measure* foi uma estratégia para que a contribuição desigual de cada metabólito fosse levada em consideração na composição deste índice final – o qual, em geral, apresentou valores mais elevados em amostras resistentes que em sensíveis.

As curvas ROC foram construídas com o auxílio do software MATLAB R2010b (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, EUA), utilizando a rotina de programação desenvolvida por Cardillo [10].

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] The Australian National University NMR Centre. Website disponível em: <<http://bloch.anu.edu.au/>> in The Australian National University. Website disponível em: <<http://www.anu.edu.au/>>. Último acesso em 25 de junho de 2010.
- [2] Ross A, Schotterbeck G, Dieterle F, Senn H. NMR spectroscopy techniques for application to metabonomics. *In*: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. Handbook of metabonomics and metabolomics. Elsevier, Amsterdam: Elsevier Science. 2007; p.55-112.
- [3] Jolliffe IT. Principal Component Analysis - Springer Series in Statistics. Springer, NY, USA. 2002; 2ª edição, 487p.
- [4] Sabbatini RME (1995). Um Programa para o Cálculo da Acurácia, Especificidade e Sensibilidade de Testes Médicos. *Revista Informédica* 2 (12): 19-21. Website disponível em: <<http://www.informaticamedica.org.br/informed/sensib.htm>>. Último acesso em 30 de junho de 2011.
- [5] Owens DK, Sox Jr HC. Medical decision making: probabilistic medical reasoning. *In*: Shortliffe EH, Perreault LE, Wiederhold G, Fagan LM. Medical Informatics. Computer Applications in Health Care. New York, USA: Addison & Wesley. 1990; p.70-116.
- [6] Fawcett T. An introduction to roc analysis. *Pattern Recog Letters*. 2005; 27: 861-74.
- [7] Swets J. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988; 240(4857): 1285-93.
- [8] Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L. Receiver-Operating Characteristic Analysis for Evaluating Diagnostic Tests and Predictive Models. *Circulation*. 2007; 115(5): 654-7.
- [9] Souza C. Análise de Poder Discriminativo Através de Curvas ROC. Website disponível em <http://crsouza.blogspot.com/2009/07/analise-de-poder-discriminativo-atraves.html>. Último acesso em 02/07/2011.
- [10] Cardillo G. Clinical test performance: the performance of a clinical test based on the Bayes theorem. Website disponível em: <<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/12705>>. Último acesso em 26/06/2011.