



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINA PEREIRA DE SOUZA MELO

**PADRONIZAÇÃO DA RMN PARA DETERMINAÇÃO
PRECOCE DA RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA NA
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA INFANTIL**

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
CAROLINA PEREIRA DE SOUZA MELO
- [assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese de Doutorado apresentada
ao Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do
título de Doutor em Genética e
Biologia Molecular na área de
Genética Animal e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M491p

Melo, Carolina Pereira de Souza, 1979-
Padronização da RMN para determinação precoce da
resistência à quimioterapia na leucemia linfóide aguda
infantil / Carolina Pereira de Souza Melo. – Campinas,
SP: [s.n.], 2012.

Orientador: José Andrés Yunes.
Coorientador: Ana Carolina de Mattos Zeri.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Metabolômica. 2. RMN. 3. Leucemia linfóide
aguda. 4. Quimioterapia. 5. Resistência. I. Yunes,
José Andrés. II. Zeri, Ana Carolina de Mattos. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Use of NMR to address acute lymphoblastic leukemia resistance to chemotherapy

Palavras-chave em Inglês:

Metabolomics

NMR

Acute lymphoblastic leukemia

Chemotherapy

Resistance

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Andrés Yunes [Orientador]

Adriana Franco Paes Leme

Anita Jocelyne Marsaioli

Marcos Borato Viana

Maria do Socorro Pombo de Oliveira

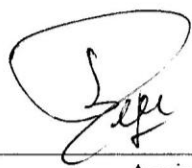
Data da defesa: 19-01-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 19 de janeiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

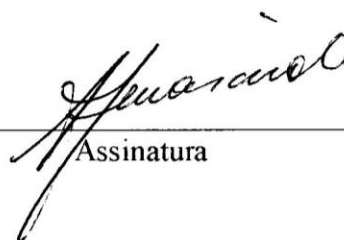
Prof. Dr. José Andrés Yunes (Orientador)


Assinatura

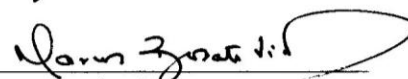
Profª. Dra. Adriana Franco Paes Leme


Assinatura

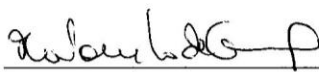
Profª. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli


Assinatura

Prof. Dr. Marcos Borato Viana


Assinatura

Profª. Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira


Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Costa Pereira

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

Assinatura

Profª. Dra. Sandra Martha Dias

Assinatura

Resumo

O uso intensivo e combinado de diferentes quimioterápicos tem permitido a cura de 70-80% das leucemias linfóides agudas (LLA) da infância. A intensidade e o uso das drogas são adaptados ao risco de recaída dos pacientes, aferido ao diagnóstico e nas primeiras semanas do tratamento. Embora existam diferenças, os principais critérios utilizados na estratificação dos pacientes nos grupos de risco são idade, contagem leucocitária, imunofenotipagem e a resposta inicial ao tratamento, mensurada pela citoredução na medula óssea e/ou sangue periférico. Este último, tem se mostrado um fator prognóstico poderoso, independente, que permite identificar pacientes com maior ou menor risco de recaída. Ao mensurar a citoredução, faz-se, indiretamente, uma avaliação *in loco*, da sensibilidade intrínseca da leucemia à quimioterapia. A proposta deste trabalho foi a implementação do uso da metodologia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para futura identificação de pacientes de LLA com resistência aos quimioterápicos usados na fase de indução. A implementação do método de RMN foi feito com células (linhagens celulares e células primárias de LLA) em cultura com doses de dois quimioterápicos: Prednisolona (PRED) e L-asparaginase (ASNase). O perfil dos metabólitos presentes no meio de cultura das células tratadas com as drogas foi obtido por meio da análise de espectros de RMN, e buscou-se associá-lo à resistência das células aos quimioterápicos. Os biomarcadores identificados neste trabalho permitiram distinguir tanto as linhagens sensíveis das resistentes quanto pacientes que recaíram dos que entraram em remissão, utilizando a técnica da metabolômica. Além disso, a análise do perfil metabólico permitiu formular algumas hipóteses sobre as vias metabólicas implicadas na resistência às drogas. Experimentos complementares com um maior número de pacientes se fazem necessários. Porém, nossos resultados indicam que este método poderá ser futuramente usado para análise de células de pacientes em tratamento, subsidiando, com maior precisão do que os métodos atuais, a alocação dos pacientes nos grupos de risco.

Abstract

Intensive and combined use of different chemotherapeutic drugs has improved the cure rate of childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) to 70-80%. Drugs use and intensity are determined based on patient relapse risk, which is measured at diagnosis and during the first weeks of treatment. Although differences may exist, the main criteria used to stratify patients in risk groups are age, leukocyte count, immunophenotyping and initial response to treatment, measured by cyto reduction in bone marrow and / or peripheral blood. The latter has proved to be a powerful independent prognostic factor, which allows identification of patients at higher or lower risk of relapse. By measuring cyto reduction, an *in situ* evaluation of the leukemia intrinsic sensitivity to chemotherapy is done indirectly. The aim of this study was to implement the use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) methodology for future identification of ALL patients resistance to chemotherapeutic agents used in the induction phase. NMR method implementation was done with cells (cell lines and primary ALL cells) kept in culture with two chemotherapeutic drugs: prednisolone (PRED) and L-asparaginase (ASNase). NMR spectra analysis provided information about the metabolic profile of drug treated cells culture medium, which was associated with the cells resistance to chemotherapeutic drugs. The biomarkers identified in this study allowed distinguishing, not only between the resistant and sensitive strains, but also between relapsed patients and those ones who remained in remission, using the metabolomics technique. Furthermore, analysis of the metabolic profile allowed the formulation of some hypotheses about the metabolic pathways involved in drug resistance. Further experiments with larger numbers of patients are needed. However, our results indicate that this method can be used for future analysis of patients treated cells, supporting, with greater precision than current methods, the allocation of patients into risk groups.

Agradecimentos

Dedico esta conquista em primeiro lugar a Deus, por sempre guiar meus passos; aos pacientes que participaram do trabalho; aos meus pais e irmãs, que sempre me incentivaram e me deram apoio incondicional; aos meus amigos e familiares, que sempre estiveram ao meu lado; ao meu marido que é meu porto seguro nos momentos mais difíceis por toda a compreensão nos momentos em que estive ausente por conta deste trabalho; aos meus orientadores Ana Carolina e Andrés, que me receberam de braços abertos em seus laboratórios, confiaram na minha capacidade e me ajudaram muito na resolução dos problemas que envolveram este trabalho e cujos ensinamentos e amizade levarei comigo pro resto da vida; a todos os meus amigos do LNBio e do Centro Infantil Boldrini (impossível citar nomes porque acho que abusei de todos em algum momento!), que foram minha família em Campinas durante esses longos 5 anos, por tudo que me ensinaram, por toda ajuda que sempre me deram e também pelos momentos de descontração que ajudaram a suportar a distância de casa; e por fim, mas não menos importante à minha amiga Sara Whittaker, a quem eu conheci graças a este trabalho mas que hoje faz parte da minha família, e que foi de fundamental importância nesses dois últimos anos com todo o apoio profissional e emocional que me deu.

A todos vocês meu muito obrigada!

Sumário

Resumo	4
Abstract	5
Agradecimentos	6
1. Introdução	8
1.1. Leucemia	8
1.2. Leucemia Linfóide Aguda.....	9
1.3. Motivação do Estudo.....	12
1.4. Metabolômica.....	13
1.5. Ressonância Magnética Nuclear	15
2. Objetivos.....	19
3. Padronização com Linhagens Celulares.....	20
PRIMEIRA PARTE	
3.1. Objetivos	20
3.2. Metodologia	20
3.3. Resultados e Discussão	26
SEGUNDA PARTE	
3.4. Objetivos	39
3.5. Metodologia	39
3.6. Resultados e Discussão	40
3.7. Conclusão Geral	41
4. Validação com Células Primárias	43
<i>Metabolomics of in vitro response of primary acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase and prednisolone in association with treatment outcome</i>	<i>43</i>
<i>Gender related differences on the in vitro response of primary acute lymphoblastic leukemia cells to prednisolone</i>	<i>76</i>
5. Considerações Finais	86
6. Anexo A: Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa.....	88
7. Anexo B: Protocolo do Depósito de Pedido de Patente	89
8. Referências	93

1. Introdução

1.1. Leucemia

A leucemia é o câncer das células que dão origem aos componentes do sangue. Estas células são produzidas na medula óssea que ocupa a cavidade dos ossos, e quando jovens, ou seja, antes do estágio final de maturação, são chamadas blastos. O sangue é composto de três tipos de células: os glóbulos brancos, ou leucócitos, responsáveis pelas defesas do organismo contra infecções; os glóbulos vermelhos, ou eritrócitos, responsáveis pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os órgãos e tecidos do corpo; e as plaquetas, ou trombócitos, responsáveis pela coagulação do sangue.

Na leucemia há uma grande produção e acúmulo de blastos na medula óssea por diversas falhas no processo de maturação, o que prejudica ou até mesmo impede a produção normal dos outros elementos do sangue. Por isso, os principais sintomas da doença são a anemia, causada pela baixa produção de glóbulos vermelhos; hemorragias, causadas pela baixa produção de plaquetas; e infecções, pois embora na leucemia os glóbulos brancos apareçam em grande número no sangue, as células doentes não protegem o organismo como o fazem as células normais. Após originar-se na medula óssea, a leucemia passa para o sangue podendo atingir outros órgãos como os gânglios linfáticos, baço, fígado, sistema nervoso central e testículos.

A leucemia é uma doença complexa, com vários tipos e subtipos que determinam o tratamento e o prognóstico do paciente. As leucemias podem ser agudas, de progressão rápida onde as células não amadurecem corretamente; ou crônicas, de progressão lenta onde as células parecem maduras, mas não são normais e por isso não atuam como deveriam. Além disso, são agrupadas de acordo com os tipos de células afetadas, podendo ser linfóide ou mielóide. Os quatro tipos mais comuns são:

- Leucemia Linfóide Aguda (LLA): afeta células linfóides e agrava-se rapidamente. É o tipo mais comum em crianças, mas também ocorre em adultos.

- Leucemia Linfóide Crônica (LLC): afeta células linfóides e se desenvolve vagarosamente. A maioria das pessoas diagnosticadas com esse tipo da doença tem mais de 55 anos. Raramente afeta crianças.
- Leucemia Mielóide Aguda (LMA): afeta as células mielóides e avança rapidamente. Ocorre tanto em adultos como em crianças.
- Leucemia Mielóide Crônica (LMC): afeta células mielóides e se desenvolve vagarosamente, a princípio. Acomete principalmente adultos.

1.2. Leucemia Linfóide Aguda

Tipo mais comum de câncer na infância, respondendo por cerca de 25% dos casos [1], a LLA é causada por uma série de anormalidades genéticas nas células precursoras dos linfócitos [2], que podem ser de linhagem B ou T. Essas anormalidades impedem o processo normal de maturação e diferenciação, levando à proliferação da célula transformada. Entre 80% e 85% dos casos de LLA são de linhagem B e as de linhagem T respondem por cerca de 15% a 20% dos casos [2].

De forma geral, o tratamento de crianças com LLA consta de três fases terapêuticas principais: indução da remissão, quimioterapia de consolidação e manutenção. A intensidade e uso das drogas são adaptados ao risco de recaída dos pacientes, aferido ao diagnóstico e nas primeiras semanas do tratamento. A intenção é que, desta forma, os pacientes classificados como alto risco recebam tratamento na intensidade apropriada enquanto que os pacientes classificados como baixo risco sejam poupados de efeitos tóxicos desnecessários.

A fase de indução da remissão tem duração de quatro a seis semanas e tem como objetivo induzir a remissão morfológica, ou seja, quando os exames não mais evidenciam células leucêmicas no sangue e na medula óssea. Nesta fase geralmente são utilizados glucocorticóides, vincristina e L-asparaginase. Uma ou mais drogas adicionais, como antraciclina ou ciclofosfamida, são incluídas no caso de crianças classificadas como alto risco, o que, no entanto, pode levar a uma maior taxa de mortalidade. Na quimioterapia de consolidação o tratamento é intensificado, geralmente com o uso de altas doses de metotrexato e mercaptopurina, mas alguns protocolos fazem uso dos mesmos

quimioterápicos utilizados na fase de indução da remissão. Por fim, uma terapia de manutenção, com duração total de dois anos ou mais, dependendo do protocolo, consiste, em geral, em doses semanais de metotrexato e diárias de mercaptopurina.

Nas últimas três décadas, o tratamento da LLA apresentou uma melhora significativa com taxas de sobrevivência global passando de 20% para 75% [3]. Os principais fatores que contribuíram para este feito foram a identificação e combinação de drogas efetivas na quimioterapia além da intensificação do tratamento com as drogas já existentes; a identificação e adoção da profilaxia pré-sintomática dos chamados “santuários”, áreas onde as células leucêmicas são protegidas da quimioterapia oral ou intravenosa, como os testículos e o sistema nervoso central, e de onde elas podem multiplicar-se após o término ou durante o tratamento, levando à recidiva; e a estratificação do tratamento baseada em grupos de risco [4]. A **Tabela 1** mostra os fatores de risco mais utilizados nessa estratificação dos pacientes. Alguns destes fatores de risco estão associados entre si. Há, por exemplo, uma preponderância de hiperdiploidia (com mais de 50 cromossomos) no grupo de pacientes portadores da translocação t(12;21), responsável pela fusão dos genes ETV6 e RUNX1, em crianças na faixa de 1 a 9 anos de idade [5].

Tabela 1. Principais fatores prognósticos da LLA utilizados na estratificação dos pacientes.

Fatores de risco	Favorável	Adverso
Idade (anos)	1 – 9	< 1 ou ≥10
Contagem leucocitária ($\times 10^9/L$)	< 50	> 50
Imunofenótipo	B	T
Genótipo	Hiperdiploidia > 50** <i>ETV6-RUNX1</i> t(12;21)	Hipodiploidia < 44** <i>BCR-ABL1</i> t(9;22) <i>MLL-AF4</i> t(4;11)
DRM* após indução	< 0,01%	≥ 1%

* Doença Residual Mínima. ** Número de cromossomos.

Retirado de Pui, C.H., *Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Formos Med Assoc, 2010. **109**(11): p. 777-87.

Dentre todos os fatores de risco, porém, o mais fortemente associado à ocorrência de recidiva é a presença de níveis relativamente altos de doença residual mínima (DRM) durante e ao final dos três primeiros meses do tratamento (**Figura 1**) [6]. A DRM é uma medida *in vivo* da resposta do paciente de LLA à quimioterapia, que reflete tanto a

resistência intrínseca dos blastos leucêmicos às drogas quanto variações inter-pacientes da ação farmacológica das mesmas e, por isso, proporciona informação prognóstica superior a todos os fatores prognósticos clássicos conhecidos [7].

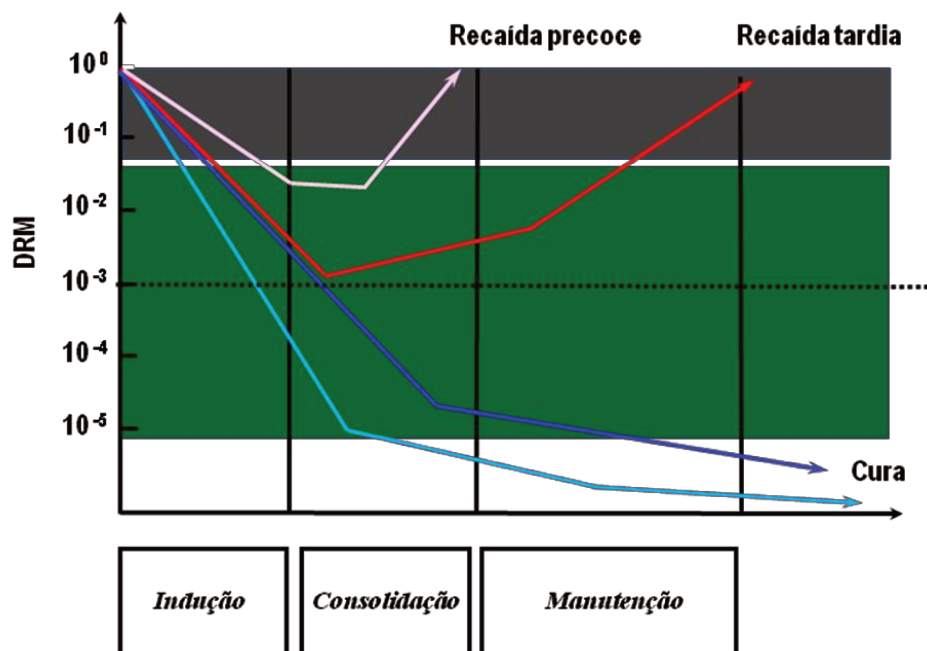


Figura 1. Gráfico da relação entre o nível de DRM presente no paciente de LLA nas diferentes etapas do tratamento e o prognóstico do mesmo. Pacientes com alto nível de DRM ao final da fase de Indução tendem a uma recaída precoce (curva em rosa), enquanto que aqueles com baixos níveis de DRM, indicando que responderam bem à primeira fase do tratamento, têm grandes chances de cura (curva em azul claro). Uma nova medida realizada após a fase de consolidação diferencia aqueles que tiveram um nível intermediário de DRM detectado após a primeira etapa do tratamento (curvas em azul escuro e vermelho). Nesse caso, níveis altos de DRM indicam a tendência a uma recaída tardia (curva em vermelho).

Crianças com DRM negativa, ou seja, não detectada ao fim da indução têm um excelente prognóstico e devem ser submetidas a um tratamento menos intenso. Por outro lado, crianças com altos níveis de DRM, ou seja, DRM positiva ao fim da terapia de indução devem ter seu tratamento intensificado com urgência, ou até mesmo ser submetidas a tratamentos alternativos, principalmente quando os altos níveis de DRM persistem na fase de consolidação [8, 9] (**Figura 2**). Recentemente, foi demonstrado que a estratificação do

tratamento de pacientes adultos com LLA também pode ser substancialmente aperfeiçoada com a inclusão da informação sobre a DRM do paciente após a terapia de indução [10].

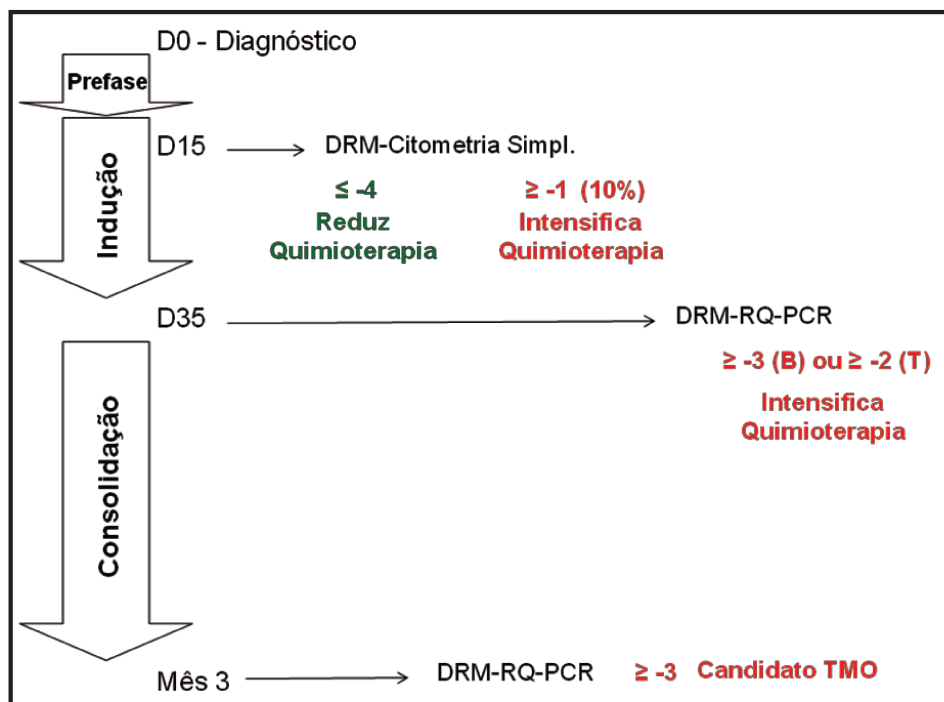


Figura 2. Exemplo da aplicação da DRM no ajuste da terapia à qual o paciente de LLA é submetido, segundo protocolo GBTLI LLA-2009. Os níveis de DRM detectados em diferentes momentos do tratamento indicam se o paciente deve ser submetido a uma terapia mais intensa e até mesmo se deve ser encaminhado ao transplante de medula óssea (TMO).

1.3. Motivação do Estudo

A resistência pré-existente ou adquirida aos quimioterápicos é um grande problema no tratamento da LLA infantil [11]. Aproximadamente 20% das crianças que atingem a remissão clínica após a fase inicial de quimioterapia (primeiros 28 dias de tratamento) sofrem recaída da doença [12]. Caso a recaída seja precoce (até os 36 meses após diagnóstico) as chances de cura são de apenas 10% [13]. Estima-se que aproximadamente 25% dos pacientes que apresentam excelente resposta nos atuais regimes terapêuticos poderiam receber um tratamento mais brando, com diminuição significativa das seqüelas e sem comprometimento em sua boa resposta clínica. Pacientes que não alcançam a cura poderiam ter suas chances aumentadas se fossem identificados ainda no início do

tratamento e submetidos a regimes terapêuticos mais agressivos e/ou alternativos. Fica claro, portanto, a importância de uma classificação efetiva dos pacientes em diferentes grupos de tratamento.

Uma vez que a resposta à terapia é influenciada pela sensibilidade das células leucêmicas às drogas e pelas características farmacodinâmicas e farmacogenômicas do paciente, a medida *in vivo* ou *in vitro* dessa resposta tem grande poder prognóstico. Experimentos *in vitro* demonstraram a importância da quimiossensibilidade da célula leucêmica na evolução clínica do paciente [14, 15].

Acreditamos que a implementação da metodologia de Metabolômica [16, 17] permitirá a identificação precoce de pacientes com resistência aos quimioterápicos, e com várias vantagens operacionais em relação aos atuais métodos de acompanhamento da resposta inicial ao tratamento. A análise dos metabólitos derivados da ação dos quimioterápicos permitirá identificar pacientes com resposta diferenciada ao tratamento, seja pela sensibilidade intrínseca das células cancerosas à quimioterapia, ou pela habilidade da terapia, interagindo com o metabolismo do paciente, em alcançar os níveis plasmáticos e celulares adequados das drogas citotóxicas. A posse desta informação tem uso imediato no ajuste da terapia dada aos pacientes. Em longo prazo, a caracterização dos tipos e proporções dos diferentes metabólitos permitirá tecer hipóteses sobre o mecanismo de resistência em curso, conseqüentemente contribuindo para o desenvolvimento de melhores estratégias de controle.

1.4. Metabolômica

A metabolômica combina o uso de tecnologias analíticas sofisticadas de identificação e quantificação de metabólitos celulares com métodos estatísticos de análise multivariada para a extração da informação e a interpretação dos dados [18]. Se considerarmos que os metabólitos são intermediários ou produtos finais do metabolismo celular, pode-se dizer que a metabolômica promove uma “leitura funcional do estado fisiológico” de uma célula ou de um organismo [19]. Diversas técnicas podem ser utilizadas na detecção desses metabólitos dentre elas técnicas de separação, como eletroforese capilar (CE), cromatografia gasosa (CG) e cromatografias líquidas de alta e ultra performance

(HPLC e UPLC, respectivamente); técnicas de detecção, como espectrometria de massas (MS) e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN); além de técnicas mistas como 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 [20-22].

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 [23-25]. A **Figura 3** mostra um esquema das etapas envolvidas neste tipo de análise. Vários trabalhos publicados nessa área apresentam resultados excepcionalmente promissores, seja no diagnóstico e na seleção da terapia [26, 27], na avaliação do efeito da terapia escolhida [28] ou na determinação da progressão da doença [29].

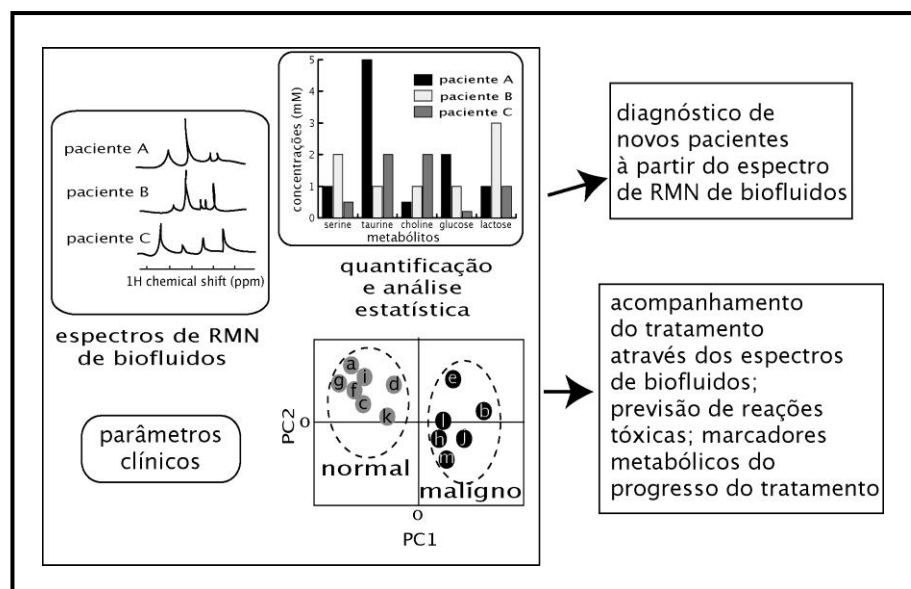


Figura 3. Esquema das etapas de uma análise de Metabolômica, neste caso utilizando espectros de RMN.

Até o presente, a maioria dos trabalhos de metabolômica aplicados à leucemia foi realizada com linhagens celulares. Num dos estudos utilizando ^{13}C -RMN, os autores

testaram o efeito do mesilato de imatinib em três linhagens de leucemia mielóide crônica, e observaram que a linhagem sensível à droga apresentava repressão da via glicolítica e aumento do metabolismo mitocondrial [30]. Em outro estudo, desta vez com três linhagens de leucemia mielóide aguda tratadas por 24h com bezafibrato e acetato de medroxiprogesterona, os autores observaram que a diferença metabólica evocada pelos quimioterápicos foi menor do que aquela previamente observada entre as linhagens não tratadas, e que 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 (ROS) [31].

Mas existem também trabalhos feitos com blastos de pacientes com leucemia. Em um deles, os autores utilizaram HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) para quantificar os metabólitos de células de pacientes com LLC tratadas com cladribina, fludarabina e desoxicoformicina e identificar o perfil metabólico característico a cada droga [32]. Outro trabalho, também com blastos de pacientes com LLC, utilizou ^1H -RMN para determinar uma associação entre os perfis metabólicos e os diferentes genótipos para regiões variáveis da cadeia pesada de imunoglobulina (reconhecidamente de valor prognóstico), sugerindo que a quantificação de metabólitos poderia ser uma alternativa viável para a estratificação de pacientes com LLC em grupos de risco [33]. Já em um estudo com células-tronco hematopoiéticas coletadas no sangue periférico de pacientes com linfoma (Hodgkin e não Hodgkin), os autores observaram através dos perfis metabólicos que em alguns pacientes essas células apresentavam disfunções mitocondriais constitutivas, que resultavam em uma ação exacerbada das ROS geradas pela quimioterapia e radioterapia para o tratamento da doença. O excesso desses compostos seria responsável por causar mutações no genoma destas células, provocando mielodisplasia ou LMA nestes pacientes após o tratamento do linfoma [34].

1.5. 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 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: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P [35].

Na natureza os núcleos magneticamente ativos dos átomos orientam seus pólos magnéticos livremente de forma aleatória. No entanto, quando colocados na presença de um campo magnético, os núcleos se alinham no sentido do campo, podendo estar orientados de forma paralela (α) ou anti-paralela (β) à direção deste. A diferença de energia entre estas duas orientações é diretamente proporcional à força do campo magnético aplicado e, portanto, quanto maior o campo, maior a sensibilidade do espectrômetro de RMN (**Figura 4**).

Inicialmente direcionados à síntese orgânica e à física molecular, como determinação das propriedades de cristais, à elucidação da estrutura de proteínas e às técnicas de imagem por ressonância magnética, os estudos embasados na propriedade da RMN de alguns átomos têm se voltado cada vez mais para a metabolômica. Neste ramo de pesquisa, o candidato preferencial tem sido o núcleo do átomo de ^1H , 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 [31, 36-38] 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 [35]. Como 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, esta técnica permite ainda a preservação de amostras escassas ou raras [72].

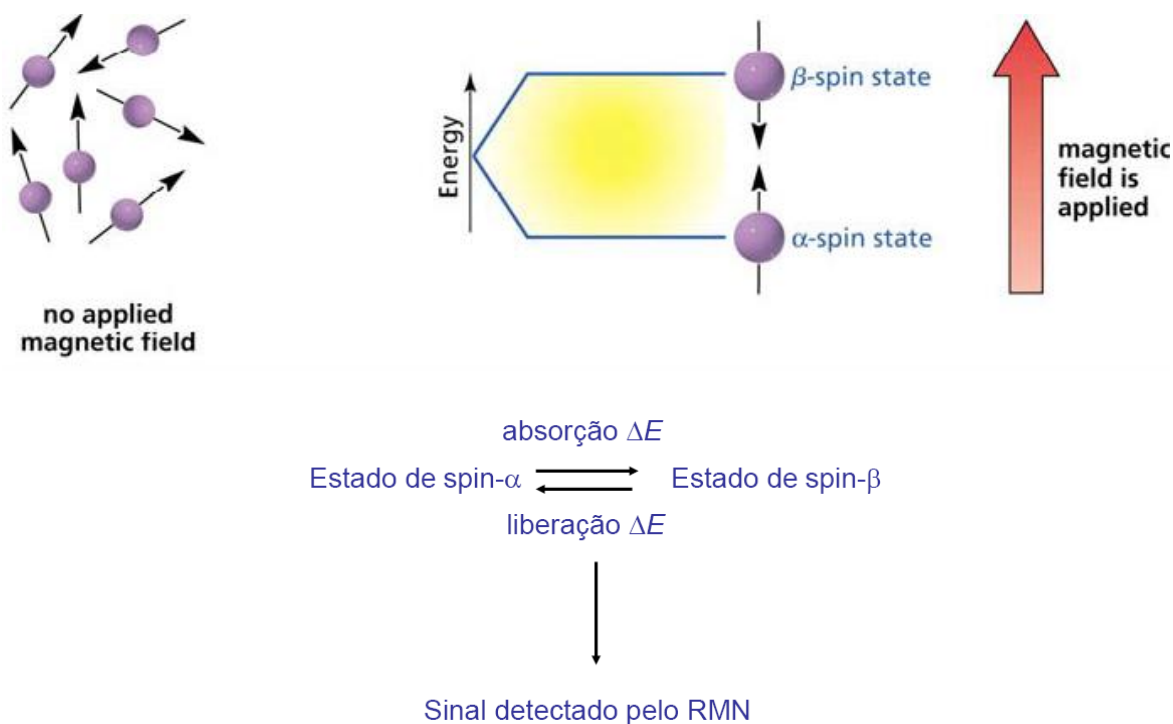


Figura 4. Esquema da teoria por trás da espectroscopia de RMN. Na presença de um campo magnético os núcleos podem se apresentar em dois estados diferentes de energia, dependendo da sua orientação com relação à direção do campo. A mudança de um estado de energia para o outro, gera o sinal detectado pelo RMN.

Para interpretação de um espectro de RMN são considerados principalmente três fatores. O deslocamento químico, medido relativamente a um padrão interno, tem sua origem na interação das nuvens eletrônicas ao redor do núcleo analisado com o campo externo aplicado e é o que determina a posição de um sinal de RMN no espectro. Um hidrogênio próximo a um grupo “retirador” de elétrons, ou seja, um átomo eletronegativo como os halogênios ou o oxigênio, por exemplo, está menos blindado eletronicamente e por isso o campo efetivo que atua sobre ele é maior, assim como seu deslocamento químico. Hidrogênios quimicamente equivalentes, isto é, com o mesmo ambiente eletrônico, originam picos na mesma posição. O segundo fator é a multiplicidade do sinal, que oferece informação sobre a vizinhança dos prótons, ou seja, o efeito dos hidrogênios vizinhos não equivalentes. Um hidrogênio situado num carbono adjacente ao carbono que possui o hidrogênio em análise desdobra o sinal deste último num duplete. Os núcleos de hidrogênio separados por mais do que dois átomos de carbono não exibem geralmente esse

desdobramento. Por fim, a integração da área sob o pico revela o número de prótons responsável por este pico e é usada para quantificar os compostos analisados. Estes fatores são exemplificados na **Figura 5**.

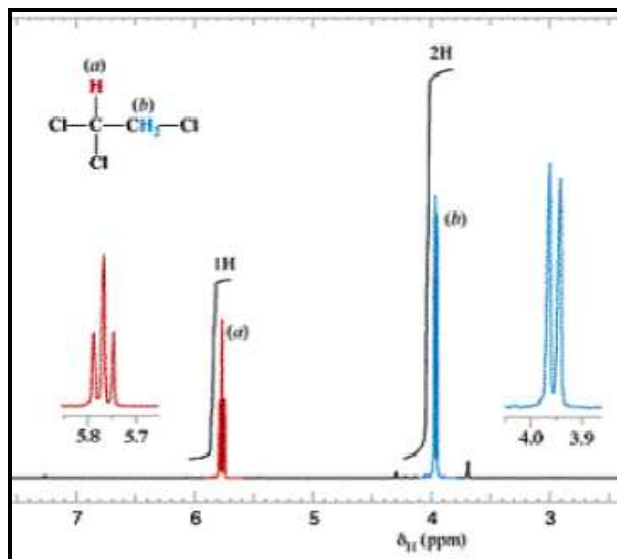


Figura 5. Interpretação dos espectros de RMN. Os picos mostrados no espectro correspondem ao sinal dos hidrogênios de mesma cor na fórmula molecular representada na parte superior da figura. A posição dos picos no espectro é determinada pelo deslocamento químico do próton e depende do ambiente eletrônico em que este se encontra. O hidrogênio em vermelho está menos blindado eletronicamente e por isso sente um campo efetivo maior do que os hidrogênios em azul. A multiplicidade, ou desdobramento, do sinal também está diretamente relacionada à estrutura do composto. O tripleto observado no pico em vermelho (ampliação à esq.) indica que existem dois outros hidrogênios (em azul) em carbonos adjacentes ao que o hidrogênio em vermelho está ligado. Já o duplete observado no pico em azul (ampliação à dir.) indica a existência de apenas um outro hidrogênio (em vermelho) em carbonos adjacentes ao que o hidrogênio em azul está ligado. A concentração do composto é determinada pela integração da área sob o pico que corresponde ao número de hidrogênios responsáveis por este sinal.

2. Objetivos

Tendo em vista a motivação do estudo apresentada no item 1.3 da Introdução, os objetivos do trabalho foram assim divididos:

2.1. Objetivo Geral:

2.1.1. Implementar a técnica de RMN para análise metabolômica da resistência a quimioterápicos.

2.2. Objetivos Específicos:

2.2.1. Padronizar leituras de metabólitos alterados pela L-asparaginase através de RMN, usando linhagens celulares de LLA;

2.2.2. Validar a aplicação da metodologia, estabelecendo associações entre o perfil metabólico da resposta de células de pacientes de LLA pediátrica a quimioterápicos *in vitro* e a resposta dos mesmos à quimioterapia.

Neste projeto trabalhamos com os quimioterápicos L-asparaginase (ASNase) e Prednisolona (PRED), utilizados nas fases de indução da remissão ou intensificação do tratamento contra a LLA infantil [39, 40]. Já se sabe que a resistência dos pacientes a ambos quimioterápicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, está associada a um pior prognóstico [15]. A ASNase reduz o nível de asparagina e glutamina no sangue, no líquido cérebro-espinal e na medula óssea [41]. Como as células linfoblásticas não possuem atividade suficiente da asparagina sintetase (proteína responsável pela produção da asparagina) e por isso requerem asparagina do meio externo [42, 43], esta redução acaba levando à morte celular. A queda na concentração de glutamina provavelmente também está envolvida com os efeitos citotóxicos deste quimioterápico [44]. O glucocorticóide PRED, por sua vez, bloqueia a progressão do ciclo celular e induz a apoptose nas células de LLA.

3. Padronização com Linhagens Celulares

Dada a dificuldade do cultivo de células primárias, alguns parâmetros da metodologia foram primeiramente otimizados em testes com linhagens celulares de LLA. Os ensaios de padronização foram feitos com apenas um dos quimioterápicos utilizados nesse estudo, a ASNase, e foram utilizadas ao todo seis linhagens celulares, três sensíveis e três resistentes à essa droga. Essa primeira fase do trabalho foi dividida em duas partes, sendo a primeira constituída dos ensaios planejados inicialmente, e a segunda de ensaios elaborados a partir dos resultados obtidos na primeira parte.

PRIMEIRA PARTE

3.1. Objetivos

- 3.2.1 Determinar a melhor metodologia para a extração do conteúdo celular para posterior análise por RMN;
- 3.2.2 Determinar o tempo de tratamento com o quimioterápico necessário para que as concentrações dos metabólitos no meio de cultura das células tornem-se significativamente diferentes;
- 3.2.3 Determinar o perfil metabólico das linhagens celulares sensíveis e resistentes à ASNase.

3.2. Metodologia

3.2.1. Meio de cultura

Todas as linhagens celulares 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 CO₂ a 5%.

3.2.2. Determinação da sensibilidade das linhagens à ASNase

A escolha das linhagens celulares para este estudo foi feita a partir do trabalho desenvolvido por Fine et al.[45]. Como as linhagens podem sofrer alterações metabólicas após longo tempo em cultura, a dose LC₅₀ (dose que mata 50% das células) para cada linhagem foi determinada por meio de curvas dose-resposta à ASNase. Neste estudo consideramos sensíveis as linhagens com LC₅₀ menor do que a dose de ASNase que seria utilizada nos experimentos posteriores (0,8UI/ml), e resistentes aquelas com LC₅₀ maior do que este valor.

Para a classificação das linhagens celulares com relação à resistência à ASNase utilizou-se a metodologia adaptada de Tada et al.[46]. Resumidamente, 60.000 células foram cultivadas em uma placa de 96 poços por quatro dias, com seis doses diferentes da droga. A sobrevivência celular foi quantificada pelo método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], corante amarelo que é reduzido a um sal de formazan de cor púrpura nas mitocôndrias de células vivas. Uma vez completado o tempo de incubação (4 dias), acrescentou-se 20 µl de MTT, incubou-se por 4,5 horas na estufa à 37°C e em seguida, adicionou-se 100 µl de uma solução de SDS (dodecil sulfato de sódio, Sigma-Aldrich) (10%) e ácido clorídrico (0,01M) para solubilização do sal de formazan durante a noite. No dia seguinte a placa foi analisada por absorbância no comprimento de onda de 570 nm no espectrofotômetro *Microplate Reader Expert Plus* (Asys Hitech - Eugendorf, Áustria). Quanto maior a absorbância medida, maior a metabolização do MTT pelas células, logo, maior o número de células vivas.

3.2.3. Extração do conteúdo celular

Foram testados dois métodos de extração celular: um que utiliza Ácido Perclórico (APC) [47] e outro que utiliza Metanol e Clorofórmio (M/C) [48]. Em ambos os casos as células foram previamente separadas do meio de cultura por centrifugação, lavadas três vezes com tampão fosfato-salino PBS (Phosphate Buffered Saline) e congeladas a -80°C.

No primeiro método, APC 6% gelado foi adicionado ao pellet de células congelado. A mistura foi então sonicada e centrifugada. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio, centrifugado para remoção do sal formado e liofilizado. O extrato

celular foi então ressuspensão em 600 µl de D₂O e analisado por RMN. No segundo método, metanol e clorofórmio (2:1) a 4°C foram adicionados ao pellet de células congelado. Para cada 10⁷ células foram utilizados 250 µl. A mistura foi então sonicada (5 x 1 min) e, após a adição de água e clorofórmio (1:1) na mesma quantidade da solução anterior, centrifugada (13000 rpm por 20 min). O sobrenadante (fase aquosa) foi liofilizado e ressuspensão em 600 µl de D₂O para análise por RMN. Neste método, para maior eficiência, o pellet foi extraído duas vezes. Foram testadas diferentes quantidades de célula a fim de se definir qual o número mínimo para se obter um espectro de RMN de boa qualidade para cada método.

3.2.4. Determinação do tempo de cultura

O objetivo deste experimento foi observar o metabolismo das linhagens ao longo tempo na presença de ASNase, podendo assim determinar quanto tempo após a adição do quimioterápico as concentrações dos metabólitos no meio de cultura tornam-se significativamente diferentes. A dose de ASNase (0,8UI/ml) utilizada no tratamento das linhagens corresponde à uma dose intermediária aos valores de corte previamente descritos para discriminar a sensibilidade e resistência *in vitro* de células primárias de LLA à ASNase [49]. Além disso, é um valor próximo ao da dose plasmática que promove 90% de deaminação da asparagina e da glutamina, encontrado nos pacientes em tratamento com ASNase [50].

Para este experimento, duas linhagens celulares (Nalm6 e RS4;11) foram mantidas em cultura *overnight*, na concentração de 2 x 10⁶ cel/ml, com um volume final de 100 ml. No dia seguinte, acrescentou-se ASNase em duas concentrações diferentes: 0,8UI/ml, dose na qual apenas uma das linhagens (RS4;11) apresenta sensibilidade; e 3,6UI/ml, dose na qual ambas as linhagens apresentam sensibilidade. A amostra controle foi preparada nas mesmas condições, porém sem o quimioterápico. Amostras do meio de cultura foram coletadas nos tempos 0h, 3hs, 6hs, 12hs e 24hs após a aplicação do quimioterápico e analisadas por RMN.

3.2.5. Determinação do perfil metabólico

Três linhagens celulares sensíveis (Nalm21, Nalm29 e RS4;11) e três resistentes (Nalm6, 697 e REH) à ASNase foram mantidas em cultura na concentração de 2 x 10⁶

cel/ml, em meio acrescido de ASNase (0,8UI/ml), com um volume final de 100 ml. As linhagens celulares Nalm21 e Nalm29 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Akira Harashima, do Hayashibara Biochemical Labs, do Japão. Experimentos controle foram feitos para cada amostra nas mesmas condições, porém sem quimioterápico. Após o tempo de cultura (24hs), determinado pelo experimento anterior, foi coletada uma amostra do meio para análise por RMN. O experimento foi feito em triplicata.

3.2.6. *Aquisição dos espectros de RMN*

Para a análise por RMN, a 480 µL de meio de cultura filtrados por um filtro Microcon YM-3 (Millipore, Massachusetts, EUA) para eliminação de macromoléculas, foram adicionados 60 µl de água deuterada (D₂O 99,9%; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Massachusetts, EUA) e 60 µl de uma solução 5mM de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Massachusetts, EUA), usado como referência interna, em 100 mM de tampão fosfato, pH 7.0. Em seguida, 550 µl da amostra foram transferidos para um tubo de RMN de 5 mm.

Espectros unidimensionais de ¹H foram obtidos a 500 MHz, utilizando um espectrômetro Varian Inova (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA), com sequência de pulsos “1D presat” otimizadas para supressão do sinal da água, de acordo com as especificações utilizadas na obtenção dos espectros contidos na biblioteca de metabólitos que serviu como parâmetro na determinação das concentrações (**Figura 6**). 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. Para a correção da fase e da linha de base dos espectros, assim como a identificação e quantificação dos metabólitos presentes nas amostras utilizou-se o programa Chenomx NMR Suite 5.2 (Chenomx Inc., Edmonton, Canadá).

3.2.7. *Identificação dos picos desconhecidos através de experimentos TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)*

Para os picos de difícil identificação foi utilizada a técnica de espectroscopia bidimensional denominada TOCSY, a qual permite aprimorar as análises feitas por RMN

de prótons. Experimentos desse tipo, com mais de uma dimensão espectral, permitem correlacionar diferentes picos do espectro correspondentes ao mesmo composto e por isso são muito úteis na análise de picos que não são prontamente identificados numa comparação com a base de dados, devido a superposições, por exemplo. O espectro obtido é um mapa de correlações entre prótons acoplados por interações com elétrons situados a distâncias de até quatro ligações químicas. Desta forma, prótons ligados em um mesmo sistema de spins, tal como em um aminoácido, são identificados. Isto faz com que esta técnica seja também bastante utilizada em biologia estrutural para o assinalamento dos sinais das cadeias laterais dos aminoácidos em uma proteína. Os parâmetros usados para aquisição do espectro TOCSY foram os mesmos da aquisição 1D, descritos acima.

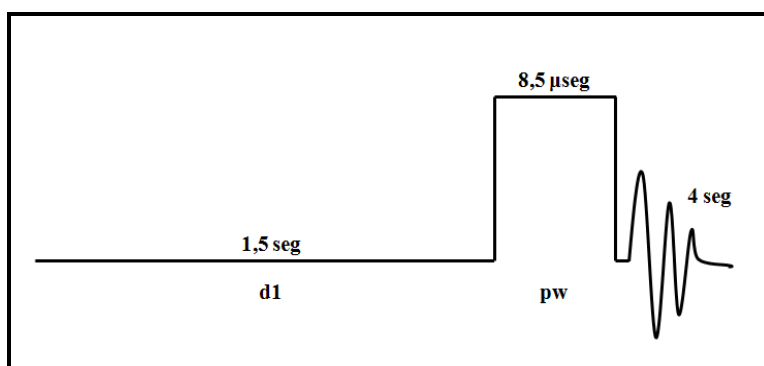


Figura 6. Sequência de pulsos “1D presat”.

3.2.8. Análise multivariada

Para a análise metabolômica utilizaram-se dois métodos de processamento dos dados (**Figura 7**). O primeiro foi o *Targeted Profiling*, baseado na identificação de sinais de pequenas moléculas presentes na mistura. Neste caso, programas com bibliotecas de espectros previamente adquiridos para cada composto são utilizados para identificação e quantificação dos metabólitos. O segundo foi o método *Spectral Binning*, baseado em análises de padrões. Nesta técnica, os espectros a serem analisados são sobrepostos e divididos em pequenas janelas as quais serão comparadas uma a uma entre os vários espectros. Têm-se então, dados correspondentes a intensidades em várias regiões ao longo do espectro ao invés de dados de concentração. Esta etapa também foi feita com o auxílio do programa Chenomx, que permite que se exportem dados em ambos os formatos.

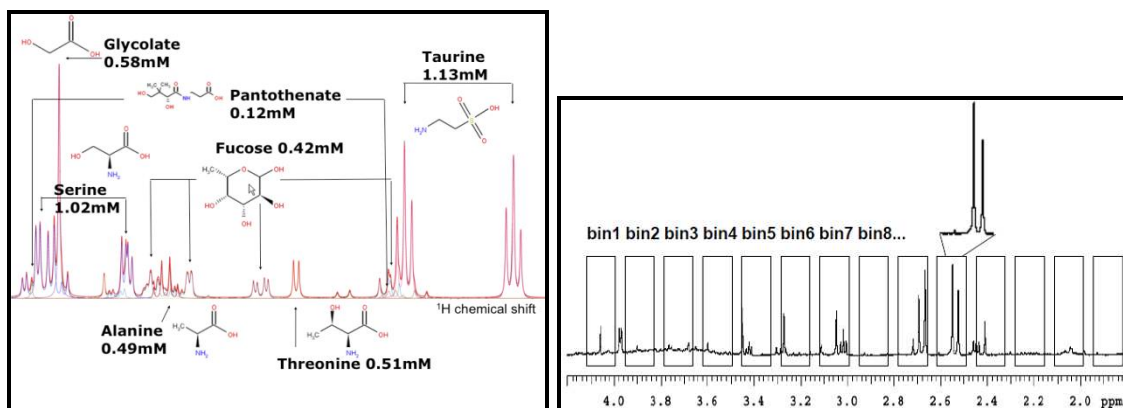


Figura 7. Métodos de processamento dos espectros antes da análise metabolômica. À esquerda, o método *Targeted Profiling* e à direita, o método *Spectral Binning*.

Após o processamento dos espectros, submetemos os dados a uma análise exploratória não supervisionada utilizando a técnica de PCA (*Principal Component Analysis*). Esta técnica é baseada no reconhecimento de padrões e expressa os dados de maneira a realçar suas similaridades e diferenças [51] e sua principal vantagem é reduzir o número de dimensões sem que haja perda significativa de informação.

Para a criação de modelos de classificação optamos pelo uso da análise de PLS-DA (*Partial Least Squares for Discriminant Analysis*), uma extensão supervisionada da técnica de PCA, que tenta maximizar a separação entre os grupos. Os resultados dessa análise são gráficos de *scores* e *loadings*, gerados a partir de variáveis latentes (LV's), que classificam as amostras e descrevem os parâmetros que proporcionam a separação em classes distintas. A qualidade dos modelos foi avaliada pelos coeficientes de validação (rVal) e calibração (rCal). O primeiro refere-se à capacidade de predição do modelo para novas amostras. O segundo refere-se ao quão bem o modelo descreve as amostras do conjunto de treinamento utilizado na construção do mesmo. Em ambos os casos, quanto mais próximo de 1 for o valor, melhor o modelo. As análises de PCA e PLS-DA foram feitas utilizando-se o programa Pirouette 4.0 (Infometrix Inc., Washington, EUA).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Determinação da sensibilidade das linhagens à ASNase

Nesta etapa foram utilizadas as linhagens celulares de LLA 697, Nalm6, Nalm21, Nalm29, REH e RS4;11. A **Tabela 2** mostra algumas características dessas linhagens.

Tabela 2. Características das linhagens celulares.

Linhagem Celular	Translocação	Gene Fundido
Nalm6	t(5;12) (q33.2;p13.2)	
REH	t(12;21)	<i>TEL/AML1</i>
697	t(1;19) (q23;p13)	<i>E2A/PBX1</i>
Nalm21	t(9;22)	<i>BCR/ABL</i>
Nalm29	t(9;22)	<i>BCR/ABL</i>
RS4;11	t(4;11)	<i>MLL/AF4</i>

Retirado de Fine, B.M., et al., *A genome-wide view of the in vitro response to L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Res, 2005. **65**(1): p. 291-9.

As curvas dose-resposta dessas linhagens à ASNase, podem ser vistas na **Figura 8**. Para este estudo as linhagens celulares 697, Nalm6 e REH foram consideradas resistentes à ASNase, enquanto que as linhagens RS4;11, Nalm21 e Nalm29 foram consideradas sensíveis.

3.3.2. Extração do conteúdo celular

O método de extração por APC foi mais rápido (cerca de 3hs), menos trabalhoso e necessitou de uma quantidade grande (10^7), porém menor, de células que o método por M/C para a obtenção de um espectro de qualidade. Porém, não permitiu obter uma boa repetibilidade dos dados. Já o método por M/C gastou aproximadamente o dobro do tempo, foi bem mais trabalhoso e precisou de uma quantidade de células dez vezes maior. No entanto, apresentou uma ótima repetibilidade dos dados e um espectro com menos ruído. A **Figura 9** ilustra a diferença entre os espectros obtidos com os dois métodos.

Com isso, concluímos que apesar das dificuldades apresentadas, o método que utiliza M/C é melhor por ser menos agressivo e por permitir maior repetibilidade dos dados. Como raramente se consegue uma concentração tão alta de células de pacientes ao

diagnóstico, a utilização da análise por RMN do extrato celular na estratificação dos pacientes de LLA estaria sujeita à aquisição de uma nova sonda de volume menor e mais sensível. Por isso, os experimentos subsequentes foram feitos apenas com o meio de cultura das células.

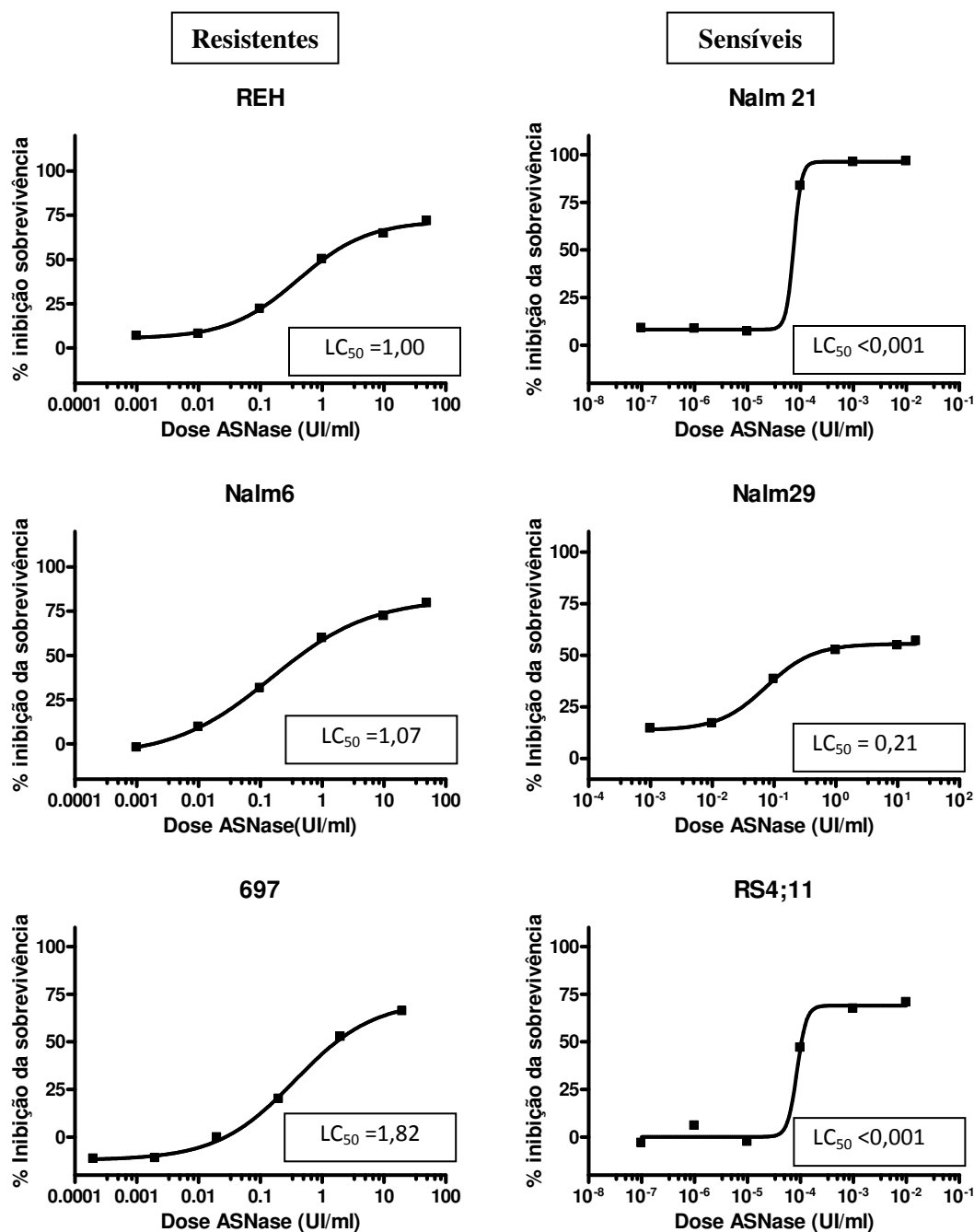


Figura 8. Curvas dose-resposta à ASNase das linhagens celulares de LLA utilizadas neste estudo. À esquerda, as linhagens consideradas resistentes e à direita, as linhagens consideradas sensíveis.

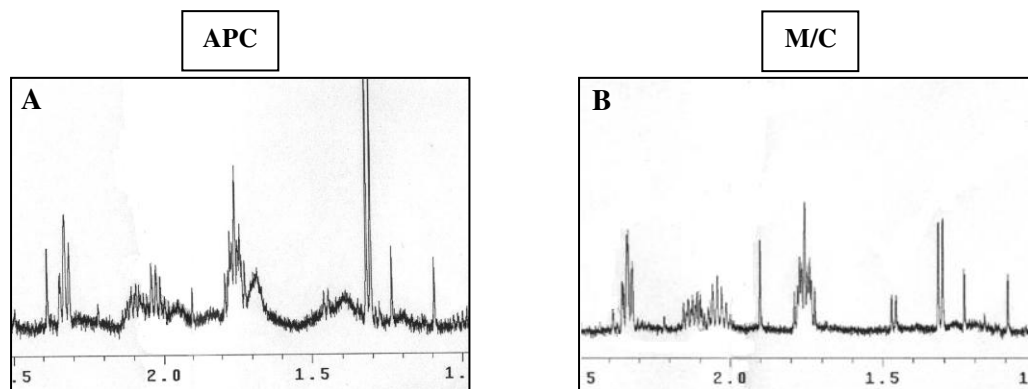


Figura 9. Espectros de RMN do conteúdo celular extraído pelos métodos que utilizam (A) ácido perclórico e (B) metanol/clorofórmio. O segundo método permite a obtenção de um espectro com menos ruído, mas como o sinal é menos intenso é necessária uma quantidade de células dez vezes maior em comparação com o primeiro.

3.3.3. *Processamento dos espectros de RMN*

Entre as duas opções para gerar os dados de saída do programa Chenomx, os quais seriam utilizados na análise multivariada posteriormente, optamos pelo *Targeted Profiling* por duas razões. A primeira é que para que se obtenham resultados confiáveis com o uso do *Spectral Binning* é necessário que se tenha um alinhamento perfeito entre os espectros, o que nem sempre é possível mesmo com o uso de tampão para controle do pH na solução (**Figura 10A**). Além disso, esta técnica considera o espectro inteiro na análise, inclusive o ruído. E, para minimizar o efeito deste na análise multivariada, os dados são centrados na média, de forma que os maiores picos tenham maior peso no resultado final. O problema é que se os metabólitos responsáveis pela distinção entre as classes de interesse estiverem em baixas concentrações na amostra analisada, os picos correspondentes a estes serão desprezados por estarem próximos ao ruído, o que resulta em uma perda significativa de informação para o modelo de classificação final. E, como seria observado posteriormente após a análise utilizando o *Targeted Profiling*, alguns compostos responsáveis pela classificação das linhagens em sensível ou resistente à ASNase se enquadram nesta situação (**Figura 10B**).

Mesmo com o uso do Chenomx que possui uma extensa biblioteca de metabólitos, a identidade de alguns compostos com picos em áreas de sobreposição precisou ser

confirmada por meio dos espectros de TOCSY (**Figura 11**) e com o auxílio de bancos de dados disponibilizados na internet (HMDB - Projeto Metaboloma Humano e *Madison Metabolomics Consortium Database*). Um programa de acesso livre, que também pode ser utilizado para esta análise, é o MetaboMiner, criado pelo Dr. David Wishart. Esta base de dados contém espectros TOCSY para metabólitos isolados que podem ser superpostos ao espectro adquirido, permitindo a identificação destes.

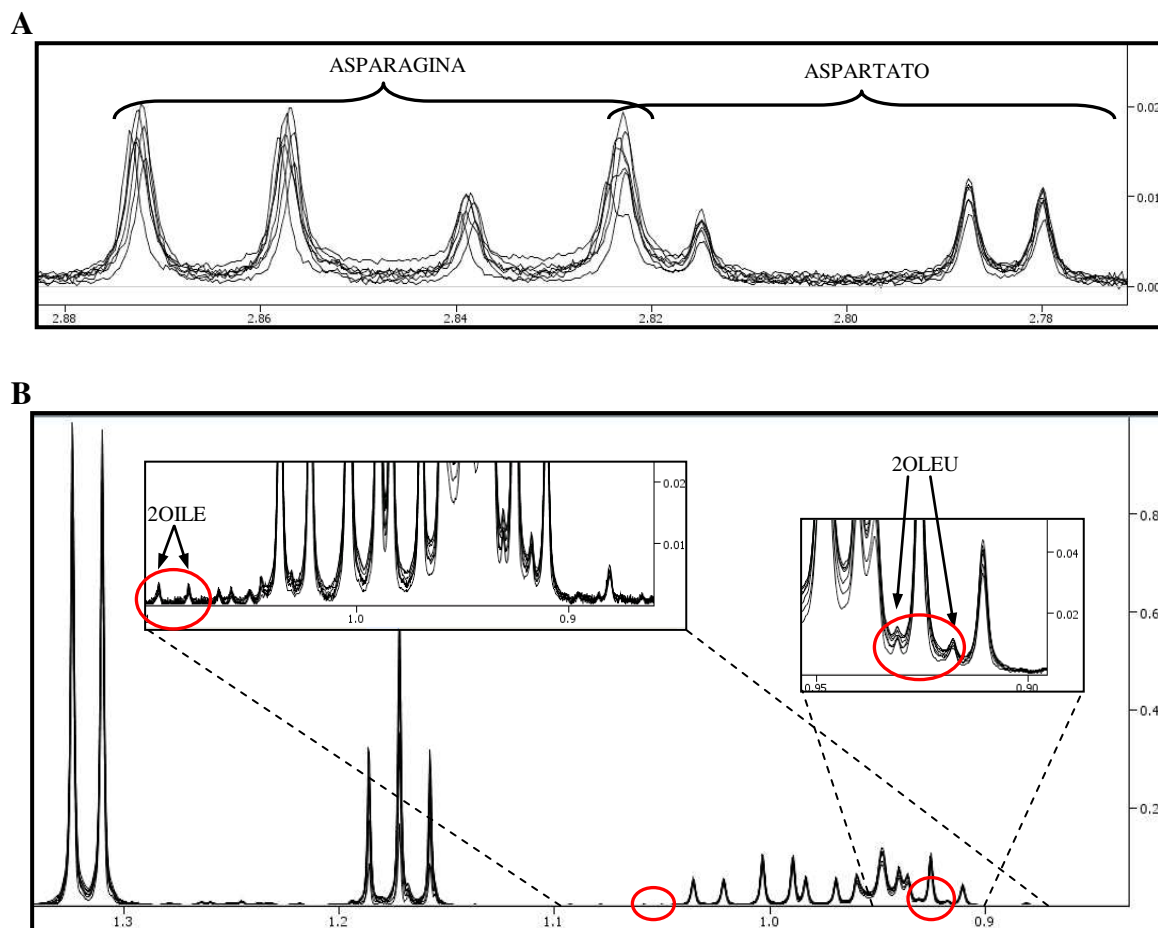


Figura 10. Sobreposição de sete espectros de RMN adquiridos do meio de cultura das linhagens celulares após 24hs em cultura. (A) Mesmo com o uso de tampão para controle do pH, os picos de alguns compostos, como a asparagina, não se alinham perfeitamente, ao contrário de outros como o aspartato, por exemplo. (B) Picos desprezados quando os dados são centrados na média. Em destaque, dois compostos que posteriormente seriam considerados importantes para a classificação das amostras com relação à resistência à ASNase, 2OLEU (2-oxoleucina ou 2-oxoisocaproato) e 2OILE (2-oxoisoleucina ou 3-metil-2-oxovalerato).

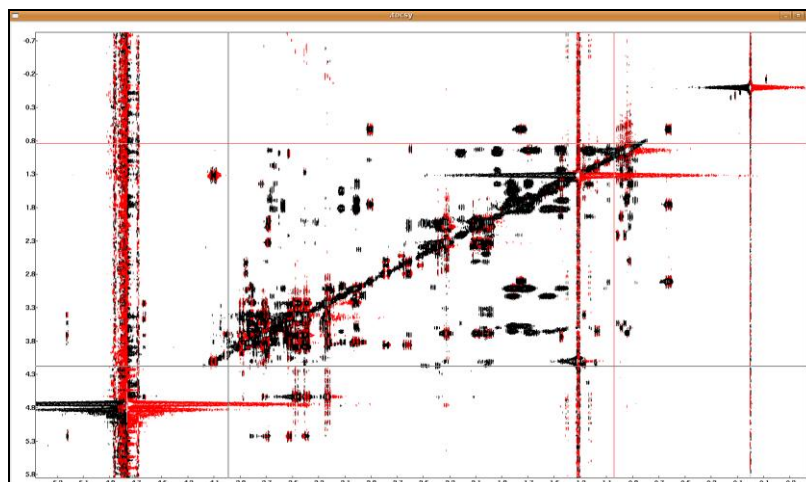


Figura 11. Representação gráfica do experimento de TOCSY. As coordenadas dos pontos fora da diagonal representam posições no espectro de RMN de uma dimensão de picos com diferentes deslocamentos químicos, mas que pertencem ao mesmo composto.

3.3.4. Determinação do tempo de cultura

Após determinarmos que não seria viável a análise do extrato celular de células de pacientes (ver item 3.3.2), focamos a padronização da metodologia na caracterização do meio de cultura das linhagens celulares. Por isso, testamos qual o tempo mínimo de tratamento com ASNase necessário para se observar alterações no meio de cultura das células que as diferenciasssem com relação à resistência a esta droga.

Após aquisição e processamento dos espectros de RMN do meio de cultura das linhagens obtidos em diferentes intervalos de tempo de tratamento, os dados de concentração dos compostos identificados e quantificados foram submetidos a uma análise de PCA. No gráfico de *scores* (**Figura 12A**), observou-se uma separação clara das amostras em quatro grupos. Os grupos I e II referem-se aos meios de cultura sem ASNase (controle) das células sensíveis e resistentes, respectivamente. O grupo III representa os meios de cultura das células resistentes, tratadas com ASNase na dose mais baixa (0,8UI/ml). E o maior grupo, o IV, engloba os meios de cultura das células sensíveis, com ASNase em ambas as doses, e os meios de cultura das células resistentes, com a dose mais alta do quimioterápico (3,6UI/ml), o que é coerente, já que as células Nalm6 são sensíveis a esta dose. A única exceção neste caso é a amostra da linhagem Nalm6 correspondente ao tempo

0h de tratamento com a dose mais alta de ASNase, que está localizada no grupo III (indicada pela seta na **Figura 12A**). Talvez pelo fato de não ter havido tempo suficiente para o quimioterápico agir, esta linhagem ainda apresente um perfil metabólico semelhante ao de quando é tratada com a dose mais baixa da droga.

No gráfico de *loadings* (**Figura 12B**), que mostra a disposição das variáveis (neste caso os compostos identificados no meio de cultura) utilizando as mesmas duas componentes principais do gráfico de *scores*, é possível ver quais variáveis (compostos) são responsáveis por essa separação. Glutamina, asparagina, glutamato e aspartato separam os meios de cultura das células tratadas e controle, sendo que os dois primeiros aminoácidos estão em maior quantidade nas amostras controle e os outros dois nas amostras tratadas. As diferenças nas concentrações desses aminoácidos decorrem simplesmente da ação da ASNase. Já alanina, piruvato e metionina, separam os meios de cultura das células com comportamento sensível e resistente ao quimioterápico, sendo que a maior concentração de alanina é característica do comportamento resistente e os outros dois metabólitos característicos do comportamento sensível. Como estes aminoácidos não são diretamente afetados pela ASNase, as diferenças observadas são provavelmente decorrentes do metabolismo distinto das células. De maneira geral, podemos dizer então que a primeira componente principal separa as amostras entre tratadas e controle, enquanto a segunda, separa entre sensível e resistente.

Acompanhando a variação da concentração dos compostos diretamente afetados pela ASNase com o tempo de tratamento (**Figura 13**) observamos que a asparagina é rapidamente degradada a aspartato graças à ação da ASNase, independentemente da dose do medicamento utilizada. Já a glutamina é degradada a glutamato devido a uma atividade residual de glutaminase do quimioterápico, porém de forma bem mais lenta quando se usa a concentração menor de ASNase.

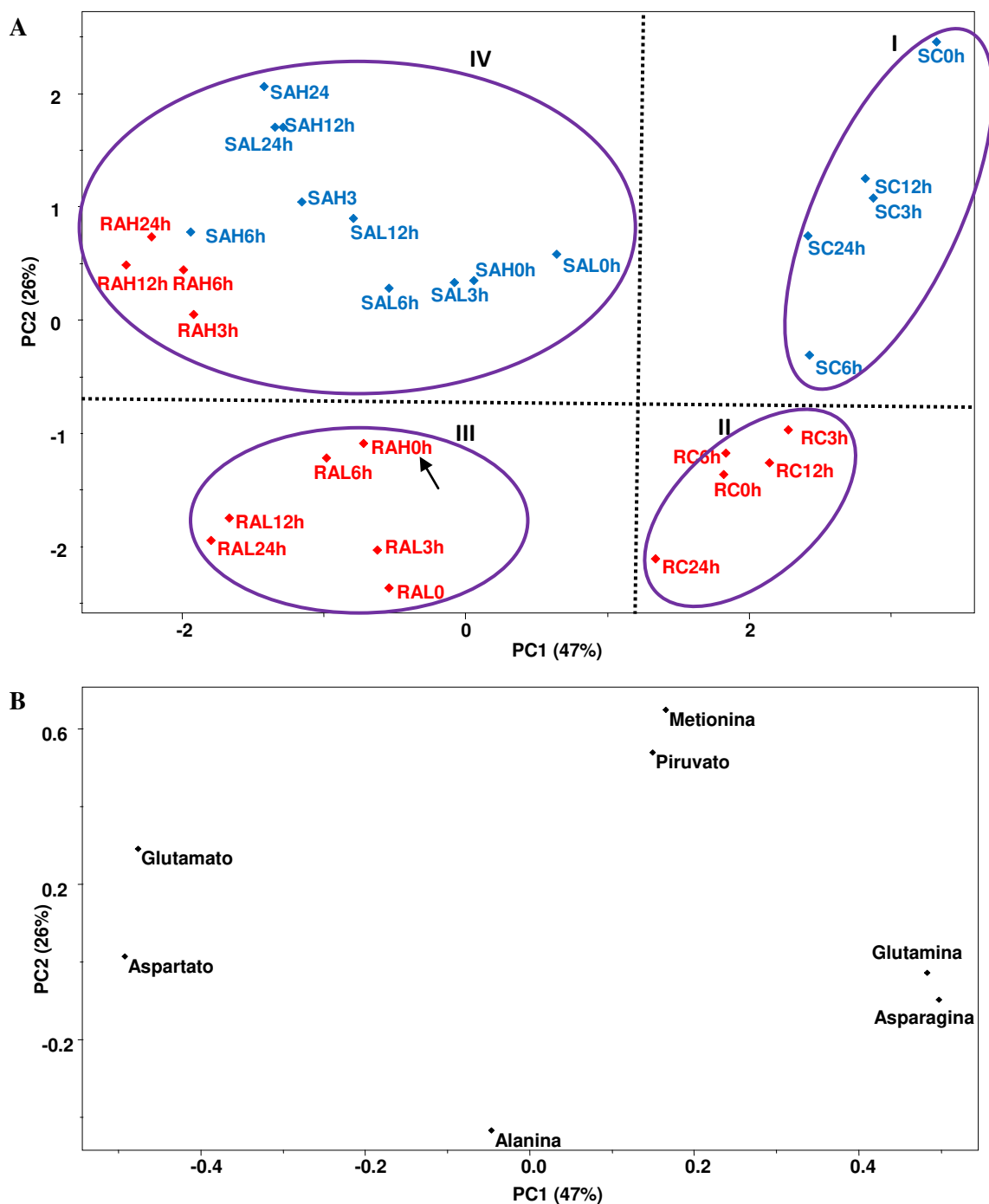


Figura 12. Análise de PCA dos metabólitos quantificados no meio de cultura. **(A)** Gráfico de *scores* mostrando a separação das amostras em quatro grupos e **(B)** o gráfico de *loadings* mostrando os metabólitos que mais influenciam nesta separação (ver texto). Os dados foram autoescalados. PC = componente principal; SC = sensível controle; RC= resistente controle; RAL e RAH = resistente doses baixa (0,8UI/ml) e alta (3,6UI/ml) de ASNase respectivamente; SAL e SAH = sensível doses baixa (0,8UI/ml) e alta (3,6UI/ml) de ASNase respectivamente.

A glutamina é um aminoácido de grande importância para a sobrevivência de células tumorais [52] e este fato pode estar envolvido na resistência de algumas células a concentrações menores da droga. Quanto mais lenta a redução do nível de glutamina no meio de cultura, maior seria o tempo para que um aumento na expressão e na atividade da glutamina sintetase pudesse suprir a falta do aminoácido através do consumo e conversão do glutamato, como observado em um trabalho recente com células de sarcoma resistentes à ASNase [44].

Como na dose que será utilizada no estudo (0,8UI/ml) a glutamina só é completamente degradada após 24hs de tratamento com ASNase, concluímos que este seria o tempo ideal para avaliar a ação do quimioterápico sobre a atividade celular, pois é quando o medicamento provocaria as alterações mais significativas no metabolismo das células.

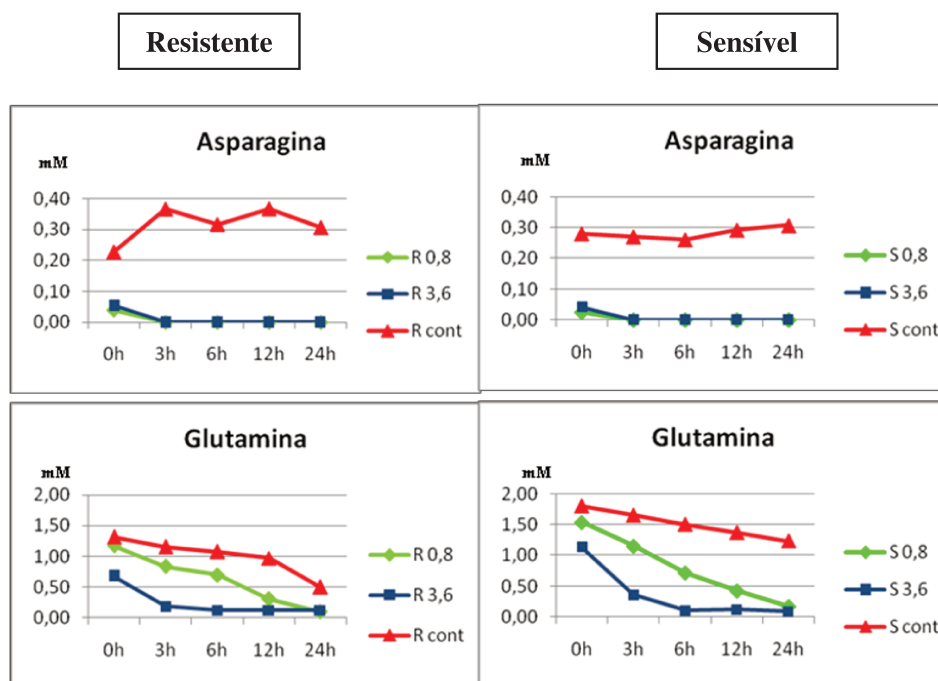


Figura 13. Variação na concentração dos metabólitos diretamente afetados pela ASNase no meio de cultura das linhagens celulares resistente (Nalm6), à esquerda, e sensível (RS4;11), à direita, com o tempo. Os níveis de glutamina e asparagina do meio foram a praticamente zero, graças à ação do medicamento. R = resistente; S = sensível; 0,8 e 3,6 = doses de ASNase utilizadas em UI/ml; cont = controle (sem droga).

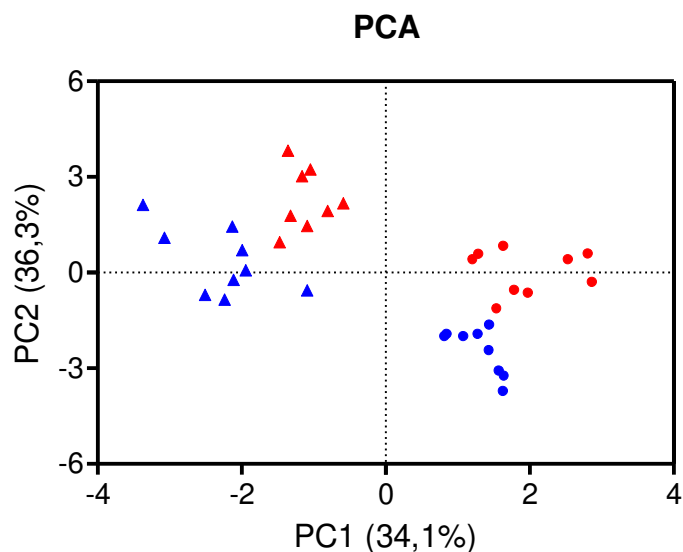
3.3.5. Determinação do perfil metabólico

Com os principais parâmetros determinados, passamos aos testes efetivos com linhagens celulares para a determinação de um perfil metabólico que permitisse a classificação das amostras com relação à resistência à ASNase. Os espectros de RMN do meio de cultura das seis linhagens celulares de LLA foram processados com o auxílio do programa Chenomx utilizando-se a técnica de *Targeted Profiling* para identificação e quantificação dos compostos presentes no meio de cultura. Com os dados de concentração dos compostos, procedeu-se à análise exploratória não supervisionada dos dados por PCA e em seguida à construção de um modelo de classificação utilizando a técnica de PLSDA.

No gráfico de *scores* da análise de PCA (**Figura 14A**) as amostras agruparam-se em quatro classes, assim como o observado no experimento anterior (**Figura 12A**). No lado esquerdo, estão as células controle, ou seja, que não foram cultivadas na presença da ASNase e no lado direito, as células tratadas, cultivadas na presença do quimioterápico. Além disso, na diagonal superior (em vermelho) estão as linhagens resistentes à ASNase e na diagonal inferior (em azul) as sensíveis. No gráfico de *loadings*, (**Figura 14B**), é possível ver quais compostos são responsáveis por essa separação. Maiores concentrações de asparagina e glutamina no meio de cultura separam as amostras controle das tratadas, que, devido à ação da ASNase, possuem maiores concentrações de aspartato e glutamato. Já o meio de cultura das células resistentes à droga, possui maiores concentrações de piroglutamato, lactato, e 5,6-dihidrotimina, enquanto o meio de cultura das células sensíveis possui maiores concentrações de glicose, 2-oxoisocaproato e 3-metil-2-oxovalerato.

A análise de PLS-DA permitiu uma separação mais clara entre as duas classes de amostras de linhagens celulares (sensível e resistente), com um intervalo de confiança de 95% (**Figura 15**). O gráfico de *scores* mostra a disposição das amostras (adquiridas em triplicata) ao longo de duas novas coordenadas, ou LV's (**Figura 15A**). Fica claro que a característica de sensibilidade/resistência é descrita principalmente pela LV1, ou seja, células sensíveis possuem valores negativos em LV1 enquanto que células resistentes possuem valores positivos. No gráfico de *loadings* podemos ver quais são os principais compostos que contribuem para esta separação (**Figura 15B**).

A



B

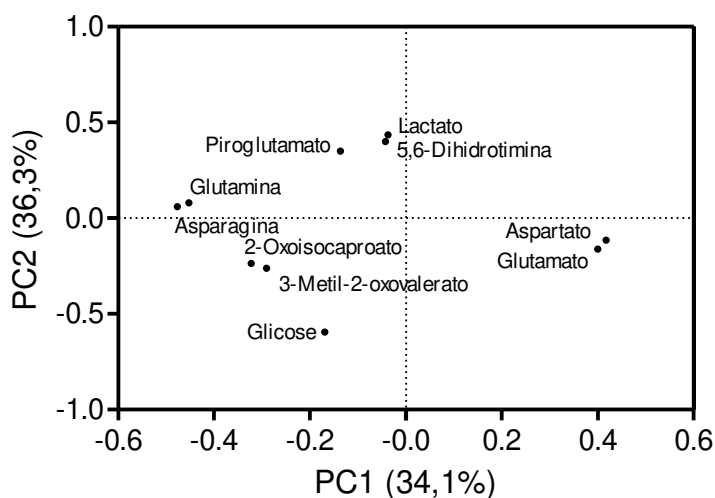
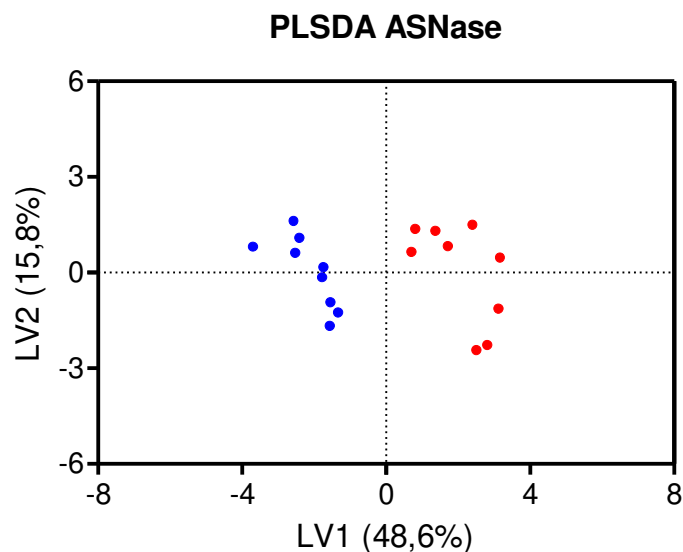


Figura 14. Gráficos de *scores* (A) e *loadings* (B) da análise de PCA dos dados de concentração dos metabólitos no meio de cultura das linhagens após 24hs em cultura. (A) As amostras agruparam-se em quatro classes distintas. À esquerda, as amostras controle e à direita as amostras tratadas com ASNase. Em vermelho as células resistentes e em azul as células sensíveis. (B) No gráfico de *loadings* é possível ver os compostos que mais influenciaram para a separação observada no gráfico de *scores*. Os dados foram autoescalados. A porcentagem entre parênteses indica o quanto do sistema está sendo descrito por cada componente principal (PC).

A



B

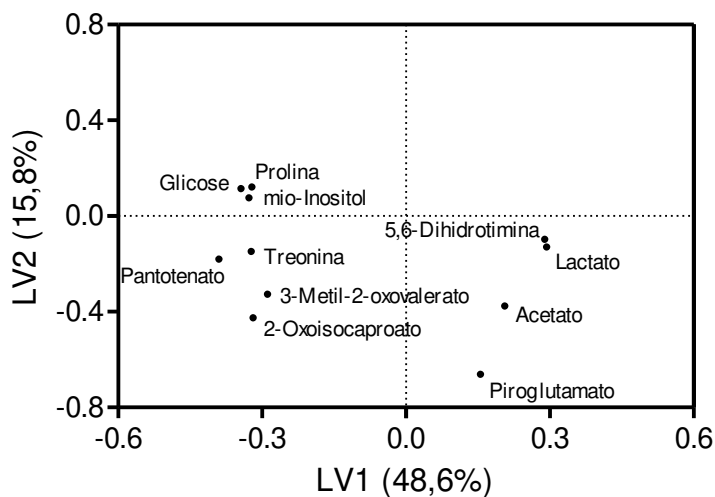
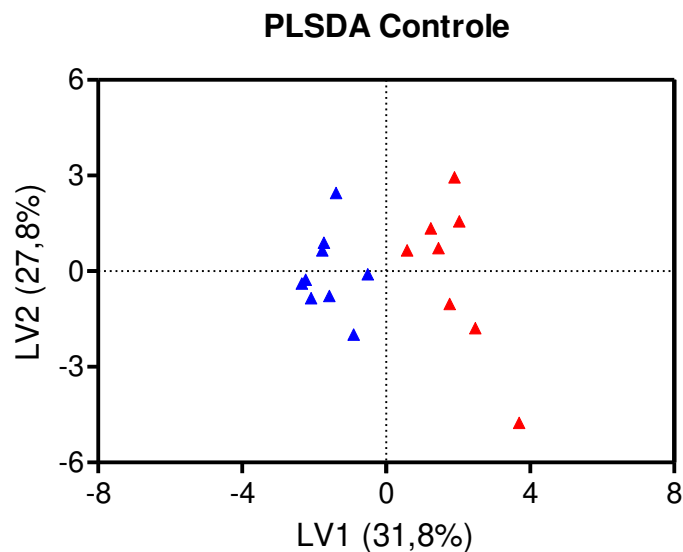


Figura 15. Gráficos de *scores* (A) e *loadings* (B) da análise de PLS-DA dos dados de concentração dos compostos presentes no meio de cultura das linhagens após 24hs em cultura com ASNase. Os dados foram autoescalados. A porcentagem entre parênteses indica o quanto do sistema está sendo descrito por cada variável latente (LV). ($r_{Val} = 0,90$ e $r_{Cal} = 0,93$ com 1 LV)

A mesma análise feita com as amostras controle, ou seja, que não foram tratadas com ASNase também permitiu uma separação, apesar de menor, entre as duas classes (**Figura 16A**). Os compostos selecionados no gráfico de *loadings* (**Figura 16B**) são basicamente os mesmos dos selecionados para as células tratadas, o que nos leva a concluir

que o metabolismo diferenciado que confere resistência às linhagens provavelmente está presente mesmo na ausência da ASNase, porém se torna mais discrepante quando na presença deste quimioterápico.

A



B

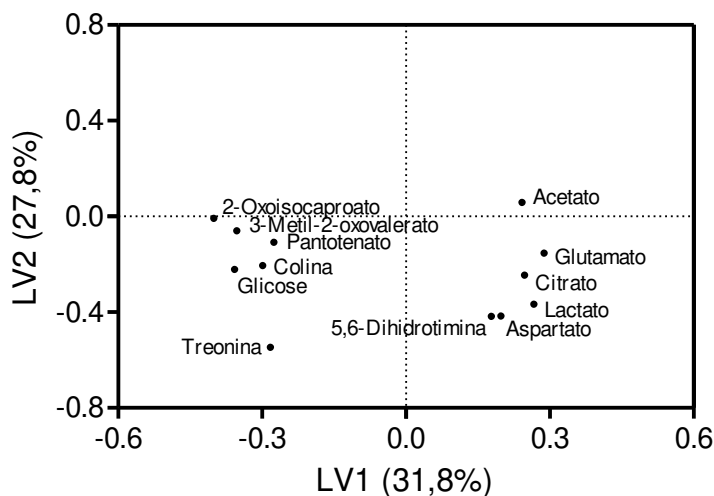


Figura 16. Gráficos de *scores* (A) e *loadings* (B) da análise de PLS-DA dos dados de concentração dos compostos presentes no meio de cultura das linhagens após 24hs em cultura sem quimioterápico. Os dados foram autoescalados. A porcentagem entre parênteses indica o quanto do sistema está sendo descrito por cada variável latente (LV). ($r_{Val} = 0,89$ e $r_{Cal} = 0,94$ com 2 LV's)

Os primeiros compostos que nos chamam a atenção são a glicose, com maiores concentrações no meio de cultura das células sensíveis, e o lactato, com maior concentração no meio de cultura das células resistentes. Além disso, o meio de cultura das células sensíveis parece refletir um menor consumo por apresentar maiores concentrações de compostos já fornecidos no meio de cultura, como treonina e colina, por exemplo. O meio de cultura das células resistentes, por sua vez, parece refletir uma maior produção com maiores concentrações de compostos como acetato e citrato, por exemplo. Em um trabalho recente [53] observou-se que a alta atividade glicolítica das células de pacientes de LLA estava ligada à resistência destas à prednisolona. Como o metabolismo glicolítico anaeróbico tem como uma das suas conseqüências a acidificação do meio extracelular pelo excesso de ácido láctico, nossos resultados sugerem que a resistência das células à ASNase também poderia estar associada a uma maior atividade glicolítica, o que justificaria uma maior concentração de lactato e uma menor concentração de glicose no meio de cultura das células resistentes.

Além desses dois específicos, outros metabólitos como o pantotenato, necessário para formação da coenzima-A, e o piroglutamato, cujo elevado nível sanguíneo pode estar associado com problemas no metabolismo da glutatona, também dão indícios de vias metabólicas que podem ser responsáveis por essa diferença de comportamento das células frente a quimioterápicos.

SEGUNDA PARTE

Com base nos resultados obtidos até aqui surgiu a hipótese de que a resistência das células à ASNase estaria ligada a uma maior atividade glicolítica, o que justificaria uma maior concentração de lactato e uma menor concentração de glicose no meio de cultura das células resistentes. Para se investigar tal hipótese, foram feitos experimentos com quatro linhagens celulares, duas resistentes (Nalm6 e REH) e duas sensíveis (RS4;11 e Nalm21) à ASNase, com o intuito de se determinar a diferença no consumo de glicose entre as linhagens e o possível efeito sinérgico que poderia existir entre a ASNase e o inibidor de glicólise 2-DG (2-deoxiglicose, ou 2-deoxi-D-glucose).

3.4. Objetivos

- 3.4.1. Medir se o consumo de glicose difere entre as linhagens sensíveis e resistentes à ASNase;
- 3.4.2. Verificar se existe sinergia entre um inibidor da via da glicólise e a ASNase.

3.5. Metodologia

3.5.1. Consumo de glicose

Para medir o consumo de glicose utilizamos um kit da Sigma-Aldrich. Resumidamente, 60.000 células foram cultivadas em uma placa de 96 poços por quatro dias sem (controle) e com 2-DG (resistente = 1mM e sensível = 0,5 mM). O 2-DG é uma glicose modificada, que é transportada normalmente para dentro da célula, mas que não serve de substrato para a hexokinase, de modo que provoca bloqueio da glicólise logo na primeira etapa.

Uma vez lançado o experimento, a placa foi incubada por quatro dias e depois o meio coletado para medir a quantidade de glicose remanescente. Para isso, a placa foi centrifugada (centrífuga Eppendorf, modelo 580R) e transferiu-se 20 µl do sobrenadante para outra placa. Adicionou-se 100 µl do reagente suprido no *Glucose (HK) assay kit* (Sigma-Aldrich) e incubou-se à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, procedeu-se à leitura da placa por absorbância no comprimento de onda de 340 nm no espectrofotômetro Microplate Reader Expert Plus (Asys Hitech - Eugendorf, Austria).

3.5.2. Teste de sinergia entre 2-DG e ASNase

Se a resistência à ASNase depende da via glicolítica, então espera-se que a inibição da glicólise torne a célula mais sensível ao quimioterápico. Para testar esta hipótese, células de LLA foram tratadas com doses crescentes de ASNase, 2-DG e a combinação de ambos, utilizando a metodologia descrita por Hulleman e colaboradores para análise da sinergia entre drogas no tratamento da leucemia [53]. Para isso, 60.000 células foram cultivadas em uma placa de 96 poços por quatro dias, com seis doses diferentes das drogas. A

sobrevivência celular foi quantificada pelo método do MTT, já descrito na metodologia da primeira parte deste capítulo.

O cálculo do fator de sinergia (F_{syn}) foi feito segundo o método descrito por Berenbaum, onde

$$F_{syn} = [Droga A_{combinada\ com\ B}] / [Droga A_{sozinha}] + [Droga B_{combinada\ com\ A}] / [Droga B_{sozinha}].$$

Um valor de F_{syn} menor do que 1 indica sinergia entre as duas drogas.

3.6. Resultados e Discussão

Como mostra a **Figura 17**, as células resistentes à ASNase apresentaram maior consumo de glicose do que a sensível Nalm21. Porém, a linhagem RS4;11, apesar de ser sensível, apresentou consumo de glicose no mesmo nível que as resistentes.

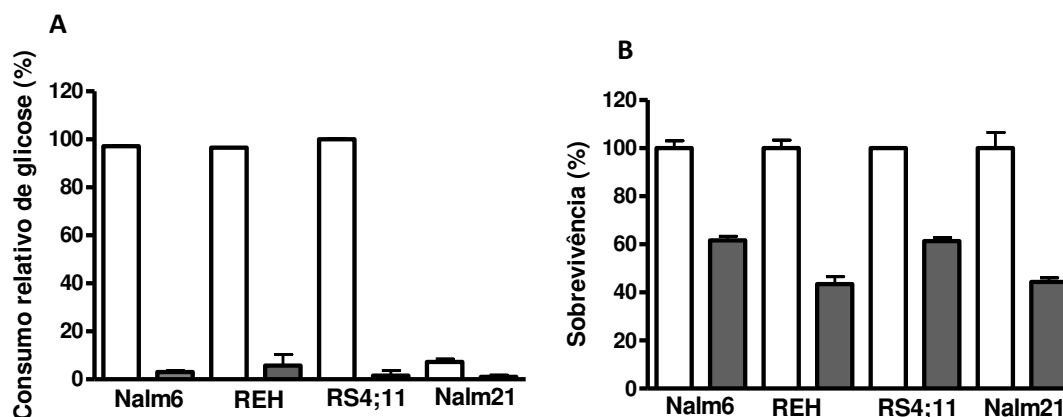


Figura 17. Consumo relativo de glicose (**A**) e sobrevivência (**B**) das linhagens celulares resistentes (Nalm6 e REH) e sensíveis (RS4;11 e Nalm21) à ASNase, tratadas (em cinza) ou não (em branco) com 2-DG. (**A**) Apesar de sensível a linhagem RS4;11 apresenta um consumo de glicose no mesmo nível das linhagens resistentes. O consumo da linhagem Nalm6 sem tratamento com 2-DG foi considerado 100%. (**B**) A dose de 2-DG utilizada corresponde à dose que mata cerca de 50% das células, sendo igual a 1 mM no caso das células resistentes e 0,5 mM no caso das células sensíveis.

A **Figura 18** mostra que a inibição da via da glicólise aumentou sinergicamente a sensibilidade das células, antes resistentes, à ASNase. Ou seja, o consumo de glicose parece ser um fator importante na resistência das células à ASNase, mas não garante por si só a

resistência, uma vez que a linhagem RS4;11 é sensível e ainda assim apresenta um consumo de glicose no mesmo nível das resistentes. Como um todo o resultado mostra que metabólitos individuais dificilmente servirão para a distinção segura da resistência ao quimioterápico, dificuldade esta que é superada quando é feita a análise conjunta de vários metabólitos.

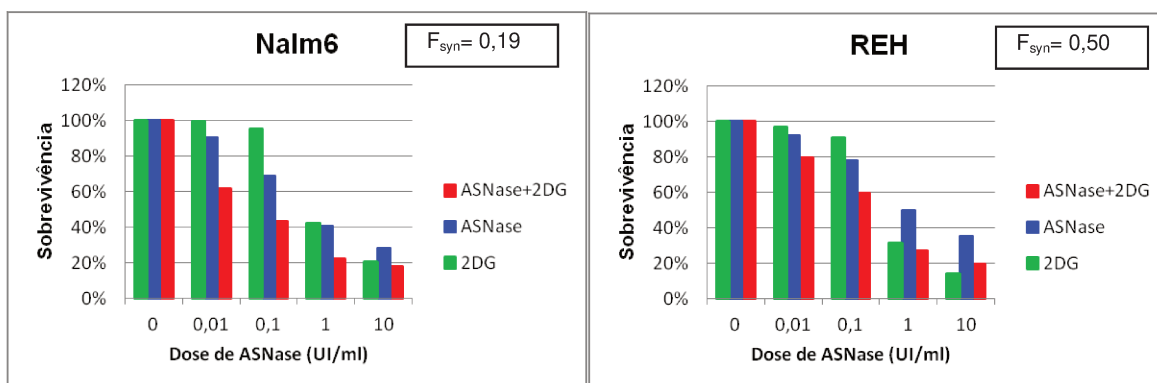


Figura 18. Gráficos de dose-resposta mostrando a interação entre ASNase e o inibidor da via da glicólise 2-DG. Observa-se uma sinergia entre as drogas para as linhagens celulares resistentes à ASNase. Nenhuma sinergia foi observada no caso das células sensíveis (dados não mostrados).

3.7. Conclusão Geral

Após os ensaios de padronização, concluímos que seria melhor utilizarmos nas análises por RMN o meio de cultura das células ao invés do extrato celular, uma vez que no segundo caso seria necessário um grande número de células para se obter um espectro com boa qualidade e reprodutibilidade. Além disso, observamos que a técnica de *Targeted Profiling* para quantificação e identificação dos compostos se aplicaria melhor aos nossos dados, já que não conseguimos um alinhamento perfeito dos espectros e também por causa da presença de compostos em baixas concentrações no meio analisado que se mostraram importantes para descrever a característica de interesse. Determinamos também que 24 hs seria o tempo ideal para se manter as células em cultura com o quimioterápico, uma vez que este é o tempo necessário para que a droga aja no meio.

Além disso, nossos resultados parecem corroborar nossa proposta inicial, de que o perfil metabólico permitiria levar a novas hipóteses sobre os mecanismos de resistência à

quimioterapia. Os testes com o inibidor da via da glicólise 2-DG, por exemplo, parecem confirmar funcionalmente a hipótese de que uma diferença no metabolismo glicolítico das células estaria envolvido na resistência dessas à ASNase. Outrossim, os resultados mostram que a estratégia metabolômica permitirá não somente a identificação precoce de pacientes com possível resistência ao tratamento, como também a identificação de moléculas alvos para desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas. O 2-DG, por exemplo, é uma droga que tem sido testada como agente anti-câncer [54].

Por fim, esses resultados preliminares indicaram que é possível se distinguir linhagens celulares resistentes e sensíveis à ASNase utilizando-se espectros de RMN do meio de cultura destas células. Dada as características particulares das linhagens celulares, as quais foram alteradas pelo longo tempo *in vitro*, resta saber se a mesma metodologia, aplicada às células leucêmicas dos pacientes sob tratamento, poderia definir um perfil metabólico característico das células resistentes.

4. Validação com Células Primárias

Metabolomics of In Vitro Response of Primary Acute Lymphoblastic Leukemia Cells to Asparaginase and Prednisolone in Association with Treatment Outcome

Carolina Pereira de Souza Melo^{1,2}, Rafael Renatino Canevarolo^{1,2}, Silvia Regina Brandalise^{1,3}, Ana Carolina Zeri^{2,5*}, Jose Andres Yunes^{1,4,5*}

¹Laboratório de Biologia Molecular, Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brazil; ²Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, Brazil; ³Serviço de Hematologia/Oncologia Pediátrica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil; ⁴Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil; ⁵These authors jointly coordinated the work.

Abstract

Background: The *in vitro* resistance of leukemic cells to anti-leukemic agents is of prognostic value in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). In this work, a metabolomic approach using ¹H NMR analysis was used to define metabolic profiles of cultured ALL cells that related to treatment outcome. **Methodology/Principal Findings:** Cells from 29 ALL patients, treated in a single institution according to the GBTLI ALL-99 protocol, were cultured for 24hrs in presence of L-asparaginase (ASNase) or Prednisolone (PRED). Fifty metabolites were identified and quantified in ¹H NMR spectra of conditioned culture media. Supervised multivariate analyses identified six metabolites (3-methyl-2-oxovalerate, dimethylamine, dimethyl sulfone, sarcosine, isobutyrate, and isopropanol) and four metabolites (histidine, 2-oxoisocaproate, sarcosine, and pyroglutamate), in culture media from ASNase- and PRED-treated cells, respectively, that were associated with patients' outcome. Discrimination of patients into poor and good outcome groups was maximal when including in the same analysis concentration data for these selected metabolites (rCal = 0.89, rVal = 0.77). ROC curve analysis was used to evaluate the potential use of the selected group of metabolites as biomarkers for ALL resistance to chemotherapy. High sensitivity and specificity were only obtained for 3-methyl-2-oxovalerate (92.9%, 63.6%), dimethyl sulfone (78.6%, 63.6%), histidine (100.0%, 54.5%) and 2-oxoisocaproate (100.0%, 54.5%). When considered together, these four metabolites

presented 92.9% sensitivity and 90.9% specificity, and correctly classified an independent set of four samples. **Conclusions/Significance:** Metabolite differences were found in the conditioned culture media of only a few (10×10^6) diagnostic ALL cells that accurately discriminated patients according to treatment outcome. Importantly, differences were only evident when ALL cells were cultured in the presence of chemotherapeutic drugs. This pilot study indicates the potential of NMR metabolomics for inferring ALL's resistance to chemotherapy, and thus for the allocation of patients into the different risk-adapted treatment groups.

Introduction

The prognosis of acute lymphoblastic leukemia (ALL) has improved considerably with advancements in therapy [1]. Many prognostic factors (age, white blood cell count at diagnosis, immunophenotype, and chromosomal aberrations) may be used, at diagnosis, for the classification of ALL patients into different risk groups [2-4]. Extensive efforts have been made over the past two decades to identify early response factors that relate to prognosis and allow the adaptation of treatment intensity according to a patient's individual risk of treatment failure, aiming improvements in survival rates while reducing toxicity [5-9].

Early response to therapy, measured as the rate of decrease in the number of residual leukemia cells known as minimal residual disease (MRD), has consistently shown independent prognostic significance in pediatric ALL [10-17]. Current treatment protocols for childhood ALL adopt MRD analysis for the allocation of patients into the different risk groups. Usually, MRD quantification is performed at two different time points: an earlier time point (day 8 or 15, for example) to address the speed of blast clearance, and at least one later time point, at the end of induction, to address the quality of remission [18-20].

The speed of early blast clearance can be attributed primarily to the intrinsic resistance or sensitivity of leukemic lymphoblasts to chemotherapy [21]. Accordingly, the *in vitro* resistance of diagnostic leukemia cells to prednisolone (PRED), vincristine, and L-asparaginase (ASNase) can discriminate patients at higher risk of induction failure or early relapse (within 2.5 years after diagnosis) in childhood ALL [21-25]. Once resistance is likely associated to drug-induced changes at the metabolic level, a metabolomic approach,

combining Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) and multivariate statistic analysis [26], may be used for early identification of drug resistant patients [27,28]. Proton NMR analysis of biofluids, like urine and blood plasma [29-32], is very sensitive and not invasive. Also, this technique requires only a small sample volume (50-600 μ l) and short data acquisition times.

^1H NMR analysis was successfully used to quantitate nonprotein feed components and metabolites in mammalian cell cultures [33]. In this work, Proton NMR analysis and chemometric methods were used to analyze the metabolic profile of short-term conditioned culture media of primary ALL cells after treatment with ASNase or PRED, two of the most effective drugs used for childhood ALL therapy. Our aim was to define metabolic profiles of cultured ALL cells that might relate to treatment outcome of the corresponding patients, which could help improve patient risk classification.

Methods

Ethics Statement

Written informed consent has been given by all patients participant of the study. Experimental procedures were approved by the ethics and research committee of the Centro Infantil Boldrini, Campinas, Brazil, in accordance with institutional guidelines.

Leukemia cell samples

Primary cell samples used for the *in vitro* experiments were obtained from a biobank of post-ficoll mononuclear cells from bone marrow aspirates of children with newly diagnosed ALL, treated between 1999 and 2010, at Centro Infantil Boldrini, according to the GBTLI ALL-99 protocol [34,35]. A total of 29 patients' samples were selected for analysis based on the availability of at least 15×10^6 cryopreserved cells. All samples had at least 84% of blasts (median=94%, Table 1). Due to the limited volume of bone marrow aspirates and the need to perform different diagnostic procedures, patients with a higher white blood cell (WBC) count at diagnosis were more likely to have cryopreserved cell samples. As a result, 27 of the 29 samples were from patients classified in the high risk group, and thus received equal treatment.

Culture of leukemia cells

Frozen ALL cells were thawed at 37°C and washed with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Cultilab). Apoptotic and dead cells were immunomagnetically removed using the Dead Cell Removal kit (Miltenyi Biotec, Germany), according to the manufacturer's instructions. Six million primary ALL cells were cultured at 2×10^6 cells/ml in the absence (control) or presence of ASNase (0.8 IU/ml; Merck Sharp & Dohme) or PRED (1 µg/ml; Sigma-Aldrich), for 24 hrs, in RPMI 1640 medium (Cultilab) supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (PS, Sigma-Aldrich), at 37°C and 5% CO₂. The same batch of culture media and supplements were used throughout the study. The concentrations of ASNase and PRED correspond to a dose in between the cut-off values previously described to discriminate *in vitro* sensitivity and resistance of primary ALL cells [36]. After the incubation period, an aliquot of 200,000 cells was collected for viability analysis and the remaining cells were pelleted by centrifugation at 1,200 rpm for 10 minutes. The pelleted fraction was frozen for future studies and the supernatant (conditioned culture medium) was aliquoted and kept frozen at -70°C for NMR analysis.

Cell viability assay

To address the possible influence of cell viability on the metabolite profile of conditioned culture media, apoptotic and dead cells were quantified using the Annexin-V / Propidium Iodide (PI, Invitrogen) double staining method. Briefly, 200,000 ALL cells were washed with PBS, resuspended in 100 µl of Annexin-V Binding Buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) plus 5 µl of Annexin-V FITC (Invitrogen) and incubated for 15 minutes at room temperature in the dark. Then, PI (to a final concentration of 5 µg/ml) and 400 µl of Annexin-V Binding Buffer were added, and 10,000 cells were analyzed using a BD FACSCalibur Flow Cytometry System (BD Biosciences, California, USA).

NMR data acquisition

Approximately 0.6 ml of conditioned culture medium was thawed and filtered at room temperature through a Microcon YM-3 column (Millipore, Massachusetts, USA). Of

this, 480 μ l was mixed with 60 μ l of deuterium oxide (D_2O , 99.9%; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Massachusetts, USA) and 60 ml of a 5 mM solution of the internal reference sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Massachusetts, USA) in 100 mM phosphate buffer, pH 7.0. Next, 550 μ l of sample was added to a 5 mm NMR tube and NMR acquisition was performed immediately. 1H -NMR spectra of samples were acquired using a Varian Inova NMR spectrometer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) equipped with a triple resonance probe and operating at a 1H resonance frequency of 500 MHz and constant temperature of 298 K (25°C). A total of 256 free induction decays (FIDs) were collected with 32-k data points over a spectral width of 16 ppm. A 1.5-s relaxation delay was incorporated between FIDs, during which a continual water presaturation radio frequency (RF) field was applied.

Spectral phase and baseline corrections, as well as the identification and quantification of metabolites present in samples, were performed using the Chenomx NMR Suite 5.2 software (Chenomx Inc., Edmonton, Canada) and the Targeted Profiling method.

Multivariate analysis

Metabolite concentrations were used in multivariate analysis in the form of unsupervised Principal Component Analysis (PCA) and supervised Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) using the Pirouette 4.0 software (Infometrix Inc., Washington, USA). Data were auto-scaled, as this method of scaling applies equal weight to all variables regardless of their absolute value, thus ensuring that all variables retain equal importance during the generation of the model. PLS-DA models were evaluated using correlation coefficients of calibration (rCal) and validation (rVal), which were calculated by internal cross-validation. Permutation tests were conducted to evaluate whether the classification obtained was significantly better than any other random classification in arbitrary groups. P -value < 0.05 was considered to be significant.

From the 29 patient selected samples four had insufficient numbers of viable cells for the control experiment and were only used as an independent validation set to test the classification model. Characteristics investigated were age, gender, WBC count, immunophenotype (B or T), percentage cell survival in culture, *in vitro* cell resistance to

ASNase and PRED (ratio of drug to control survival values), and treatment outcome. Median values were used as cut-offs for the continuous characteristics, like age and percentage of *in vitro* cell survival.

Sensitivity and specificity analysis

To assess the sensitivity and specificity of the different metabolites selected in discriminating samples we used the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis. ROC analysis is widely used to visualize, evaluate, organize, and select classifiers based on their performances [37]. This analysis was performed using Matlab R2010b software (The MathWorks Inc., Massachusetts, USA) with code developed by Giuseppe Cardillo. Beyond sensitivity, specificity and accuracy, also F-measure (the harmonic mean of precision and sensitivity [38]) was used as an indicator of predictor quality. Cut-off values were determined as the closest point to the coordinates (0,1) in the ROC plots.

Analysis was initially performed considering each metabolite individually. In a second step, metabolites that showed significant sensitivity and specificity values were analyzed collectively. To do so, two different arbitrary scoring systems were evaluated. The first one attributed one point to a sample each time it had a metabolite concentration lower than the cut-off value. In the second scoring system, the same principle was used as in the first, but the score was additionally weighted by the F-measure value of each metabolite. In this way, metabolites that performed better alone had a higher contribution to the final score.

Results

This study included samples from children with newly diagnosed ALL who were treated at a single institution according to the Brazilian GBTLI ALL-99 protocol [34,35]. Patients were classified into two groups. One comprised patients who relapsed and/or had high MRD levels ($\geq 10^{-2}$) at the end (day 28) of induction therapy. Patients with positive MRD were categorized into this group because the presence of MRD $\geq 10^{-2}$ at the end of induction therapy is strongly associated with relapse in the GBTLI ALL-99 protocol [39]. The second comprised patients that remained in complete clinical remission and were MRD negative ($< 10^{-2}$) at the end of the induction therapy. For simplicity, we will further refer to

these groups as poor responders (PR) and good responders (GR), respectively. Patients' characteristics are shown in Table 1.

Table 1. Patients' characteristics.

Patient	Diagnosis date	Age (yr.)*	Gender	WBC (x10 ³)*	Blasts (%) in BM	Immuno	Risk	MRD **	Follow up*** (mo.)	Group
1§	02/28/99	12.0	F	90.0	85	B	HR	ND	146	GR
2	05/30/00	6.4	M	18.5	88	B	HR	Pos	42 R	PR
3	07/27/00	0.5	M	190.0	89	B	HR	Neg	4 R	PR
4	08/30/00	8.9	M	113.0	90	B	HR	Pos	35 R	PR
5	09/21/00	14.4	M	59.2	95	T	HR	ND	127	GR
6	11/08/00	3.7	F	115.4	95	B	HR	Neg	126	GR
7	12/07/00	16.4	M	354.0	84	B	HR	ND	3 R	PR
8	01/23/01	1.1	F	118.8	93	B	HR	ND	13 R	PR
9	01/21/02	3.6	F	63.1	90	B	HR	Neg	111	GR
10§	05/15/02	6.8	M	132.0	95	T	HR	Neg	107	GR
11§	06/06/02	6.0	M	612.0	90	T	HR	ND	16 R	PR
12§	01/17/05	2.2	M	77.0	98	B	HR	ND	27 R	PR
13	08/31/05	3.8	M	178.0	90	B	HR	ND	30 R	PR
14	10/03/06	8.1	M	84.2	98	B	HR	ND	54	GR
15	12/27/06	13.3	F	7.4	94	B	HR	ND	14 R	PR
16	04/09/07	5.1	F	33.2	90	B	HR	Pos	48	PR
17	07/23/07	13.5	F	34.0	98	B	HR	Pos	44	PR
18	09/19/07	15.1	M	39.4	95	B	HR	Neg	42	GR
19	09/26/07	21.0	M	39.4	95	B	HR	Pos	42	PR
20	10/16/07	13.3	M	50.0	99	T	HR	Pos	40 R	PR
21	11/06/07	5.4	F	10.2	90	B	LR	Neg	41	GR
22	11/12/07	3.3	M	51.0	90	T	HR	Neg	40	GR
23	11/19/07	5.0	F	53.7	97	B	HR	Neg	40	GR
24	12/09/09	5.8	F	202.7	90	T	HR	Pos	15	PR
25	12/29/09	5.6	F	197.4	95	B	HR	Neg	14	GR
26	01/06/10	11.9	M	73.4	92	B	HR	Pos	14	PR
27 ⁺	03/11/10	10.3	M	2.6	98	B	HR	Neg	12	GR
28 ⁺	05/05/10	15.3	M	37.7	98	B	HR	Pos	10	PR
29 ⁺	05/13/10	4.8	M	10.3	95	B	LR	Neg	10	GR

*Characteristics at diagnosis. **Qualitative Minimal Residual Disease result at the end of induction (D28) (pos = positive; neg = negative; ND = not determined). *** The cutoff date for follow-up was March 1st, 2011. The median follow-up period for patients who did not have an event was of 3.5 years. R= time to relapse. § Patients excluded from initial multivariate analysis due to the lack of sufficient cells for the control experiment. These samples were treated with ASNa and PRED and data obtained were used as an independent validation set. ⁺Samples without cell survival data (see Table S1), but included in multivariate analysis. WBC, number of white blood cells in diagnosis peripheral blood; BM, Bone marrow; Immuno, immunophenotype of leukemia cells; HR, High Risk group, and LR, Low Risk group, according to GBTLI ALL-99 criteria; GR, good responder; PR, poor responder.

Patients' cells were cultured for 24hrs under three different conditions: with ASNase, with PRED, and without drug (control). To check for the influence that cell viability would have on the metabolic profiles, cells recovered from all experiments in the majority of cases (88%) were analyzed with respect to viability by an Annexin-V-based method (Table S1). *In vitro* cell resistance to ASNase or PRED was calculated by the expression:

$$\% \text{ Resistance} = \% \text{ Survival with drug} / \% \text{ Survival control}$$

In some cases, where *in vitro* survival without drug was too low, no cells were left to allow measuring the effect of drug treatment. We did not remove those cases from the analysis because any cut off point for control survival would be arbitrarily chosen since distribution analysis of control survival showed no clear categories, but a continuous pattern. Samples from PR patients had a trend for increased *in vitro* survival and resistance to PRED in comparison to GR ones, but differences were not statistically significant. This trend was apparently abrogated by the ASNase treatment (Figure S1).

Metabolic profiles

Metabolic profiles of conditioned culture media were generated using ¹H-NMR spectroscopy. A representative spectrum is presented in Figure 1. Spectra were processed using the Chenomx software, which allowed us to identify and quantify 50 compounds. Data for metabolite concentrations according to GR/PR groups and drug treatment, are presented on Table S2. Unsupervised PCA analysis of data for the 50 metabolites obtained from the control, ASNase or PRED assays showed no indication of group clustering associated with treatment outcome (Figure 2). Except for a subtle clustering associated with gender in the case of PRED-treated cells, none of the other variables analyzed showed any indication of group clustering in the unsupervised PCA analysis (Figures S2 to S4). Notably, there was no clustering in association with the *in vitro* resistance to ASNase or PRED (ratio of drug to control survival values) either, or in association with the number of surviving cells after the 24 hrs in *in vitro* culture under the different conditions tested.

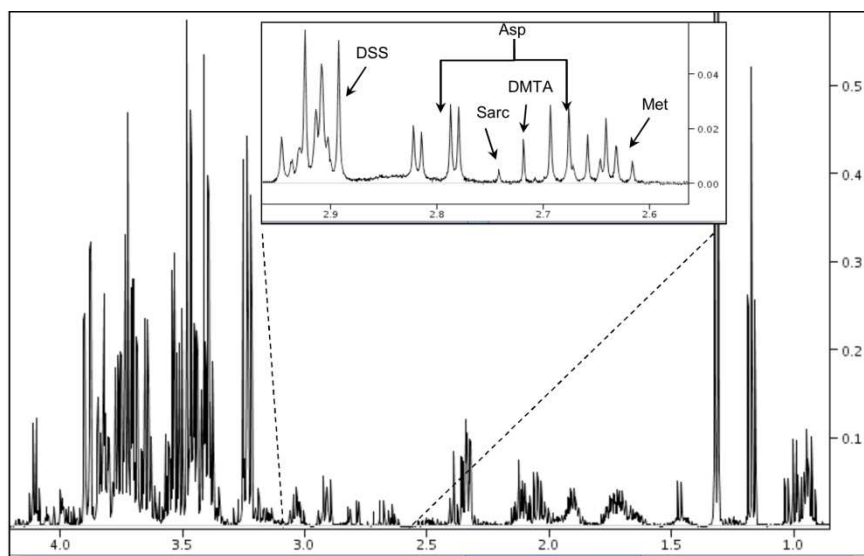


Figure 1. ^1H -NMR spectrum of conditioned culture medium from ALL cells. A representative spectrum of the conditioned culture medium of primary ALL cells treated for 24hrs with ASNase. In the small insert, expanded between 2.6 and 3.0 ppm, some metabolites are labeled (DMA = dimethylamine, SARC = sarcosine, MET = methionine, ASP = aspartate).

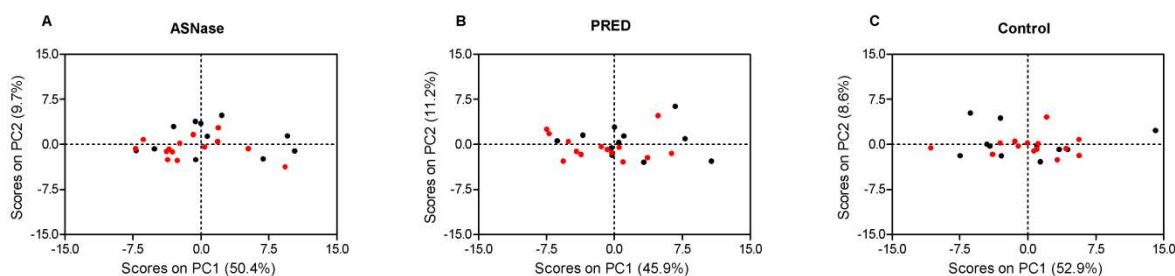


Figure 2. Scores plots of PCA analyses using all metabolites quantified in conditioned culture medium. No clustering was observed in this unsupervised analysis using metabolite concentrations of the conditioned culture medium of primary ALL cells treated for 24hrs with (A) ASNase, (B) PRED, or (C) control. Black, samples from good responder patients (GR); Red, samples from poor responder patients (PR).

To identify metabolite patterns in the conditioned culture media that differed among the two groups (PR versus GR) we performed a supervised PLS-DA analysis using the same data. Scores plots of the first two latent variables (LV) showed that the profile using the 50 metabolites from either ASNase- or PRED- treated culture media allowed a subtle separation between both groups (Figures 3A and 3B). No clear separation was obtained by

PLS-DA analysis of the conditioned culture media of untreated cells (Figure 3C), suggesting that treatment with ASNase and PRED is necessary to evoke distinct responses. Weights plots obtained using the same two LVs allowed the selection of the metabolites primarily responsible for the observed clusterings (Figures 3D and 3E). For ASNase-treated cells, concentrations of 3-methyl-2-oxovalerate (also known as 2-oxoisoleucine; 2OILE), dimethylamine (DMA) and dimethyl sulfone (DMS) were higher in the conditioned culture media of group GR, while concentrations of sarcosine, isobutyrate and isopropanol were higher in group PR. For PRED-treated cells, histidine and 2-oxoisocaproate (also known as 2-oxoleucine; 2OLEU) were present at higher concentrations in the conditioned culture media of group GR, while concentrations of sarcosine and pyroglutamate were higher in group PR (Table 2).

Table 2. Metabolites primarily responsible for the discrimination of Good (GR) and Poor Responder (PR) patient samples in multivariate analysis.

Metabolite	ASNase			PRED			Control		
	GR (n=11)	PR (n=14)	P-value	GR (n=11)	PR (n=14)	P-value	GR (n=11)	PR (n=14)	P-value
2OILE	<u>6.9 ± 1.4</u>	<u>5.4 ± 1.2</u>	<0.05	5.6 ± 1.9	5.2 ± 1.6	0.26	6.1 ± 1.3	5.0 ± 1.4	0.05
DMA	<u>15.3 ± 8.2</u>	<u>10.0 ± 6.4</u>	0.06	12.8 ± 9.3	8.9 ± 5.7	0.32	13.8 ± 8.6	9.1 ± 6.0	0.15
Histidine	59.8 ± 6.1	58.3 ± 5.1	0.44	<u>59.7 ± 4.0</u>	<u>54.7 ± 4.1</u>	<0.05	54.3 ± 8.2	54.0 ± 4.7	0.76
Isobutyrate	<u>3.5 ± 0.8</u>	<u>3.9 ± 0.9</u>	0.62	2.9 ± 1.4	2.6 ± 1.3	0.60	3.4 ± 1.1	3.4 ± 1.2	0.58
Isopropanol	<u>30.7 ± 13.1</u>	<u>34.5 ± 11.4</u>	0.36	19.3 ± 14.3	14.7 ± 9.9	0.60	20.7 ± 11.6	21.0 ± 10.7	0.91
2OLEU	7.1 ± 2.2	6.3 ± 1.5	0.19	<u>6.4 ± 2.3</u>	<u>4.3 ± 1.5</u>	<0.05	6.9 ± 1.7	6.2 ± 2.0	0.38
DMS	<u>17.4 ± 3.0</u>	<u>15.4 ± 1.6</u>	0.05	15.5 ± 3.5	14.6 ± 2.9	0.57	14.7 ± 3.5	14.3 ± 2.9	1.00
PGL	233.8 ± 65.1	220.7 ± 41.3	0.98	<u>332.3 ± 60.3</u>	<u>362.3 ± 58.4</u>	0.26	316.6 ± 58.1	326.1 ± 34.9	0.70
Sarcosine	<u>5.6 ± 1.7</u>	<u>6.0 ± 1.5</u>	0.38	<u>5.3 ± 1.6</u>	<u>5.7 ± 1.4</u>	0.34	5.0 ± 1.5	5.7 ± 1.3	0.31

Data correspond to average and standard deviation of metabolites concentration (μM) in 24 hrs conditioned culture media. P-values were calculated by the Mann-Whitney U test.

Underlined: subset of GR/PR discriminating metabolites. Data is presented for the 9 metabolites in all treatment conditions only for the sake of comparisons. (2OILE = 2-oxoisoleucine; DMA = Dimethylamine; 2OLEU = 2-oxoleucine; DMS = Dimethyl Sulfone; PGL = pyroglutamate).

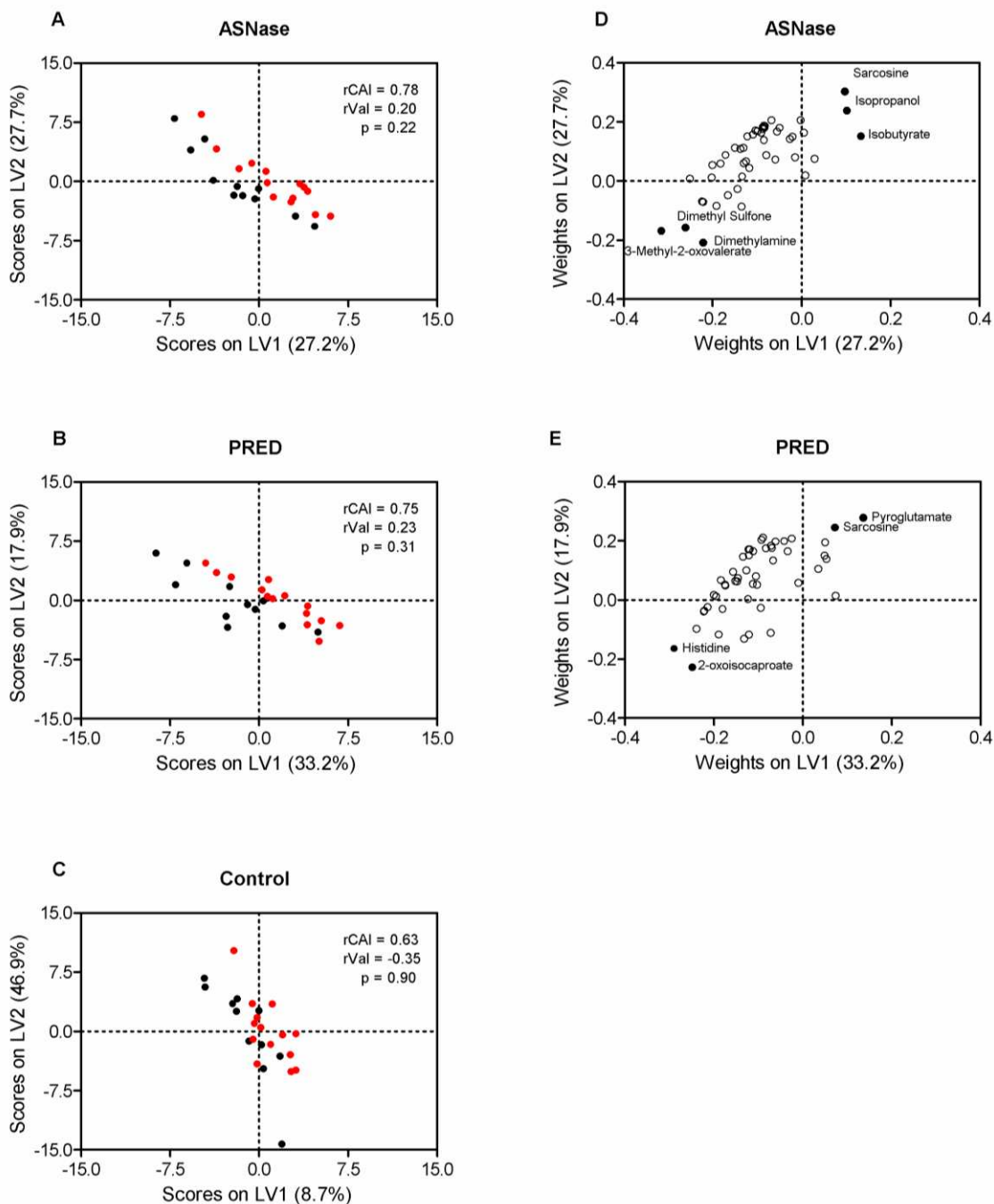


Figure 3. Supervised PLS-DA analysis using all metabolites quantified in conditioned culture medium. When class information is provided, a subtle separation can be seen between GR (black), and PR (red) groups after 24hrs of treatment with (A) ASNase or (B) PRED. The same was not observed when culture media data from untreated cells were used (C), which means that sample discrimination is dependent on the cells' response to chemotherapy. Metabolites that contributed most to the observed clustering are labeled in the loadings plots corresponding to ASNase (D) and PRED (E) treatments.

As expected, scores plots from a new PLS-DA analysis, using only the best discriminating metabolites identified in the previous PLS-DA analysis, revealed a better clustering of both GR and PR patient samples, for both treatments (Figures 4A and 4B; $P < 0.01$ for ASNase treatment and $P < 0.01$ for PRED treatment by permutation testing). When data for 2OILE, DMA, DMS, sarcosine, isobutyrate, and isopropanol in the conditioned culture media of ASNase-treated cells were analyzed in conjunction with data for histidine, 2OLEU, sarcosine, and pyroglutamate of PRED-treated cells, samples that had been misclassified initially (Figures 4A and 4B), were now correctly assigned (Figure 4C; $P < 0.01$ by permutation testing), i.e. the metabolites of the *in vitro* cellular responses to ASNase and PRED described better the patients' outcome, and consequently their response to chemotherapy, when analyzed collectively rather than individually. An independent set of patients' samples ($n=4$), cultured in under same conditions, was used to test this PLS-DA model and all were correctly assigned (Figure 4D).

Unsupervised PCA analysis of the data for these ten selected metabolites resulted in a subtle clustering of PR and GR samples, though not with respect to the other characteristics analyzed, including cell survival, either in the control or under the drug-treated conditions (Figures S5 and S6). Even supervised PLS-DA analysis on the subset of GR/PR discriminant metabolites did not allow significant classification models based on the other criteria, like gender, immunophenotype and *in vitro* survival (Figure S7). This result seems to indicate that the observed differences in the cell metabolic profiles are related to the distinct drug-response of ALL cells, and are not simply a consequence of either the number of viable cells in the assays or other differences among patients.

Spearman correlation analysis between metabolite levels and *in vitro* cell survival results were undertaken to better address the possible influence of cell death/viability on metabolite concentrations and the PLS-DA modeling result. Only one of the 'GR/PR discriminant metabolites', DMS ($p = 0.012$), seemed to correlate to the *in vitro* survival of cells under drug treatment (Table 3). It is therefore possible that DMS levels were simply measuring cell survival instead of cellular metabolism differences evoked by the drug.

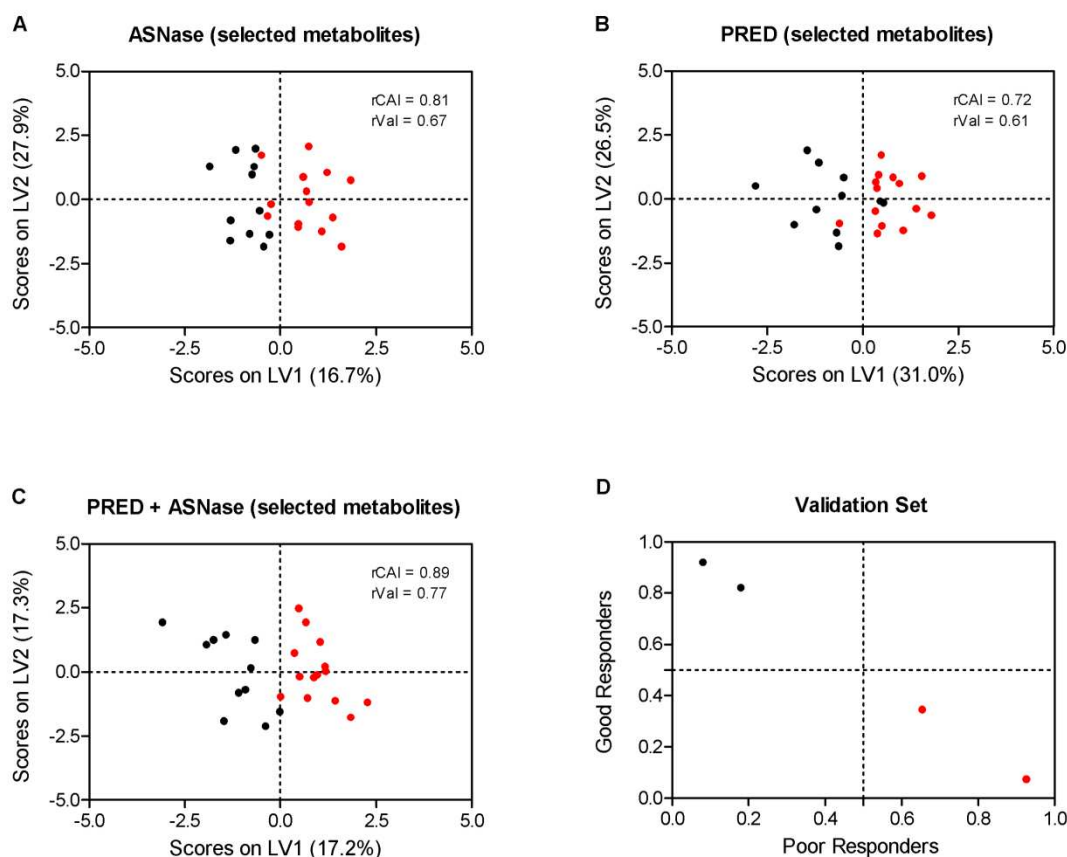


Figure 4. Scores plots of PLS-DA analysis using only the selected metabolites. PLS-DA analyses carried out using only the best discriminating metabolites identified in the previous PLS-DA analysis (Figure 3), resulted in clearer discrimination of GR (black) and PR (red) samples. (A) Analysis of data for 2OILE, DMA, DMS, sarcosine, isobutyrate, and isopropanol in the conditioned culture media of ASNase-treated cells. (B) Analysis of data for histidine, 2OLEU, sarcosine, and pyroglutamate in the conditioned culture media of PRED-treated cells. (C) When data for the selected metabolites in ASNase and PRED treatments were used together in the same PLS-DA analysis, samples previously misclassified were correctly assigned, as were a small independent set of samples used for the validation of the model (D).

Sensitivity and specificity analysis

To evaluate the potential use of the selected group of metabolites as biomarkers for ALL resistance to chemotherapy, their sensitivity and specificity were analyzed graphically by ROC curves. The parameters obtained from this analysis are shown in Table 4.

Table 3. Correlation between selected metabolites and 24 hrs *in vitro* survival under the corresponding drug treatments.

	Treatment	Metabolite	Spearman r	P-value
ASNase		2OILE	0.10	0.65
		Dimethylamine	-0.31	0.16
		Isobutyrate	-0.27	0.23
		Isopropanol	-0.01	0.96
		DMS	-0.52	<0.05
		Sarcosine	-0.36	0.10
PRED		Histidine	-0.09	0.68
		2OLEU	-0.20	0.36
		Pyroglutamate	0.34	0.13
		Sarcosine	-0.02	0.94

Table 4. Results of ROC curve analysis of selected metabolites.

Parameters	2OILE	DMS	Histidine	2OLEU	All four	Weighted
AUC	0.7954	0.6851	0.8084	0.7695	0.9578	0.9773
P value*	0.0005	0.0419	0.0002	0.0022	0	0
Cut-off	7.1	16.2	54.4	6.1	2.0	2.4460
Sensitivity	92.9%	78.6%	100.0%	100.0%	92.9%	92.9%
Specificity	63.6%	63.6%	54.5%	54.5%	81.8%	90.9%
F-measure	83.9%	75.9%	84.8%	84.8%	89.7%	92.9%
Accuracy	80.0%	72.0%	80.0%	80.0%	88.0%	92.0%

*It measures if the AUC (area under the curve) is significantly greater than 0.5 (random classifier).

From the ten metabolites selected, only 2OILE, DMS, histidine and 2OLEU showed significant sensitivity and specificity values when considered individually (Figure S8). To verify the predictive power of these metabolites, when combined, the same analysis was performed using two different scoring systems. In the first, one point was attributed to a

sample each time it had a metabolite concentration lower than the cut-off value. As all four metabolites were found at lower concentrations in the conditioned culture media of PR cells, the highest scores were classified as poor responders. The other scoring system followed the same principle, but the score was weighted by the F-measure value of each metabolite. As shown in Table 4, the weighted method yielded the highest sensitivity (92.9%) and specificity (90.9%) values. When this method was employed to classify treatment outcome of the same independent set as used previously, all of the samples were correctly assigned ($P < 0.005$).

Discussion

Recent studies have highlighted the potential for metabolomics analysis for the detection of cancers, including epithelial ovarian [40] and oral [41] (using a ^1H -NMR-based platform), as well as prostate cancers [42] (using a mass spectrometry-based platform). The work presented here, although limited by the relatively small sample size, describes for the first time that a simple short-term culture of cancer cells exposed to chemotherapy drugs followed by metabolomics analysis of the conditioned culture media may potentially be used to predict treatment outcome in childhood ALL. Multivariate analysis allowed us to identify differences in the conditioned culture media containing only a few (10×10^6) diagnostic leukemia cells that accurately discriminated patients according to treatment outcome. Importantly, differences between groups were only evident when ALL cells were cultured in the presence of chemotherapeutic drugs.

In this work ALL cells were challenged with the anti-metabolite ASNase and the corticoid PRED, which are cytotoxic drugs that have different mechanisms of action. Leukemia treatment consists in multidrug therapy, so that the patients' outcomes depend on their combined response to the different drugs used. Although certain degree of cross-resistance is expected, different leukemias (from different patients) may have variable levels of resistance to the distinct antileukemic agents. A previous study have shown that the combination of data for in vitro resistance of ALL cells towards prednisolone, L-asparaginase, and vincristine provided a drug-resistance profile with prognostic significance superior to that of any single drug, among a panel of 12 tested [21]. Likewise, we found that the combined analysis of the cellular responses to L-asparaginase (ASNase)

and prednisolone (PRED) was more discriminative for clinical outcome than that predicted by any single drug.

The metabolites that showed highest association with patients' outcome, as assessed by ROC curve analysis, were 2OILE, DMS, 2OLEU and histidine. These four metabolites were present at higher concentrations in the conditioned culture media of good responder patients. At least three of them can be related to oxidative stress. Sensitive cells showed higher sarcosine consumption than resistant ones. Sarcosine is used by cells for glycine production with hydrogen peroxide formation, a reactive oxygen species (ROS). Indeed, we observed higher levels of glycine in conditioned culture medium of sensitive cells. Amino acids are major targets for oxidation by ROS [43], and higher levels of 2OLEU and 2OILE in conditioned culture medium of sensitive cells can be a final consequence of this higher sarcosine consumption (Figure S9). Also, sensitive cells presented lower dimethyl sulfone consumption, an oxo-sulfur compound with antioxidant properties found mainly in vegetables [44-46], what could contribute for the higher amino acids oxidation observed.

In turn, the higher level of histidine on conditioned culture medium of sensitive cells can be a direct consequence of PRED treatment, which has been shown to reduces histidine decarboxylase activity of rat liver [47]. Levels of dimethylamine, isobutyrate, isopropanol, and pyroglutamate were also shown to differ in the conditioned culture media of good *versus* poor responder patients (Figure S10). The straightforward relation between metabolites and cell physiology makes these compounds promising biomarkers for disease. Further studies are needed to establish the metabolic pathways responsible for the metabolites identified here and how they may relate to ALL resistance to chemotherapy.

ALL is a heterogeneous disease. Gene expression analysis of diagnostic ALL cells has been extensively used to investigate differences in drug-resistance and treatment outcome [48-51]. However, this gene expression profiles were found to be largely driven by the underlying molecular characteristic of ALL blasts, like the presence of chromosomal translocations, making it difficult to unveil gene expression patterns associated with any other feature of interest. Despite the heterogeneity of ALL, the present study, which included both precursor B-cell and T-cell ALLs, was nevertheless able to detect differences in metabolic profiles between good and poor responder patients. The immediacy of

metabolites to cellular physiology may help explain this success. In agreement, ALL cells of different molecular sub-types were shown to share common pathways of genomic response to the same treatment [52].

In vivo ALL response to chemotherapy was shown to correlate better with treatment-induced changes in gene expression than to pre- or post-treatment gene expression profiles [52]. Likewise, our results suggest that the molecular mechanism of cellular drug-resistance may be better visualized by investigating post-treatment or treatment-inducible changes in metabolites than by simply picturing metabolic profiles of pre-treatment samples.

Many efforts have been made to improve risk classification of children with ALL. Quantification of MRD is clearly a good example of these efforts and has proven its value in the clinical setting. *In vitro* response of ALL cells to chemotherapy, evaluated by a simple colorimetric measurement of cell viability, was shown to predict early relapses. Although being a simple diagnostic tool, it requires 4 days incubation, and thus is limited by the fact that primary ALL cells tend to die when cultured *in vitro*. In a recent study including 667 patients, approximately 25% of the samples failed evaluation [5]. In addition, *in vitro* drug resistance may be confounded by this death tendency of blast cells. The assay described here takes only one day, a culture period much better tolerated by ALL cells. Most importantly, by using a metabolomic approach this assay is able to measure differences that go beyond simple cell survival, and which reflect drug-specific changes induced by chemotherapy more functionally, thereby offering increased sensitivity and specificity.

Limitations of present study

Considering the limited number of patients analyzed, we consider this work as a pilot study conducted to evaluate the potential of metabolomics for inferring ALL's resistance to chemotherapy. Prospective studies involving a larger number of patients and based on other chemotherapy drugs are warranted.

Acknowledgments

We are grateful to Sara Whittaker for the revision of the manuscript and to André Bortolini Silveira for helping with the *in vitro* culture assays of primary ALL cells. We thank Dr. Mark Viant, and Dr. Ulrich Günther, University of Birmingham (UK), for helping with multivariate analysis. We especially acknowledge the contribution of patients and their families.

References

1. Pui CH, Relling MV, Campana D, Evans WE (2002) Childhood acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 6: 161-180; discussion 200-162.
2. Pui CH, Evans WE (1998) Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 339: 605-615.
3. Greaves MF (1997) Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 349: 344-349.
4. Look AT (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278: 1059-1064.
5. Escherich G, Troger A, Gobel U, Graubner U, Pekrun A, et al. (2011) The long-term impact of *in vitro* drug sensitivity on risk stratification and treatment outcome in acute lymphoblastic leukemia of childhood (CoALL 06-97). *Haematologica* 96: 854-862.
6. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 29: 551-565.
7. Vrooman LM, Silverman LB (2009) Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr* 21: 1-8.
8. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer R, van der Velden V, et al. (2008) Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22: 771-782.
9. Brandalise S, Odone V, Pereira W, Andrea M, Zanichelli M, et al. (1993) Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. *ALL Brazilian Group. Leukemia* 7 Suppl 2: S142-145.
10. Bruggemann M, Raff T, Flohr T, Gokbuget N, Nakao M, et al. (2006) Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 107: 1116-1123.
11. Marshall GM, Haber M, Kwan E, Zhu L, Ferrara D, et al. (2003) Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 21: 704-709.
12. Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H (2000) Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 95: 790-794.
13. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, et al. (2000) Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96: 2691-2696.

14. Foroni L, Harrison CJ, Hoffbrand AV, Potter MN (1999) Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia by molecular analysis. *Br J Haematol* 105: 7-24.
15. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, et al. (1998) Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med* 339: 591-598.
16. Steenbergen EJ, Verhagen OJ, van Leeuwen EF, van den Berg H, Behrendt H, et al. (1995) Prolonged persistence of PCR-detectable minimal residual disease after diagnosis or first relapse predicts poor outcome in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 9: 1726-1734.
17. Brisco MJ, Condon J, Hughes E, Neoh SH, Sykes PJ, et al. (1994) Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 343: 196-200.
18. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, et al. (2010) Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 115: 3206-3214.
19. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, et al. (2009) Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 27: 5168-5174.
20. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, et al. (2008) Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 111: 5477-5485.
21. Kaspers GJ, Veerman AJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, Smets LA, et al. (1997) In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 90: 2723-2729.
22. Den Boer ML, Harms DO, Pieters R, Kazemier KM, Gobel U, et al. (2003) Patient stratification based on prednisolone-vincristine-asparaginase resistance profiles in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 21: 3262-3268.
23. Asselin BL, Kreissman S, Coppola DJ, Bernal SD, Leavitt PR, et al. (1999) Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 21: 6-12.
24. Kaspers GJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Van Der Does-Van Den Berg A, et al. (1998) Prednisolone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: vitro-vivo correlations and cross-resistance to other drugs. *Blood* 92: 259-266.
25. Hongo T, Yajima S, Sakurai M, Horikoshi Y, Hanada R (1997) In vitro drug sensitivity testing can predict induction failure and early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89: 2959-2965.
26. Viant MR, Rosenblum ES, Tieerdema RS (2003) NMR-based metabolomics: a powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. *Environ Sci Technol* 37: 4982-4989.

27. Di Leo A, Claudino W, Colangiuli D, Bessi S, Pestrin M, et al. (2007) New strategies to identify molecular markers predicting chemotherapy activity and toxicity in breast cancer. *Ann Oncol* 18 Suppl 12: xii8-14.
28. Merz AL, Serkova NJ (2009) Use of nuclear magnetic resonance-based metabolomics in detecting drug resistance in cancer. *Biomark Med* 3: 289-306.
29. Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E (2005) NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed* 18: 143-162.
30. Tang H, Wang Y, Nicholson JK, Lindon JC (2004) Use of relaxation-edited one-dimensional and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma. *Anal Biochem* 325: 260-272.
31. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Morgan SR, Nash AF (2003) A ¹H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J Pharm Biomed Anal* 33: 1103-1115.
32. Moolenaar SH, Engelke UF, Wevers RA (2003) Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of body fluids in the field of inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem* 40: 16-24.
33. Bradley SA, Ouyang A, Purdie J, Smitka TA, Wang T, et al. (2010) Fermentanomics: monitoring mammalian cell cultures with NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 132: 9531-9533.
34. Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, Matsuda EI, Otubo R, et al. (2010) Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group--protocol ALL-99. *J Clin Oncol* 28: 1911-1918.
35. Scrideli CA, Assumpcao JG, Ganazza MA, Araujo M, Toledo SR, et al. (2009) A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica* 94: 781-789.
36. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, et al. (2004) Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 351: 533-542.
37. Linden A (2006) Measuring diagnostic and predictive accuracy in disease management: an introduction to receiver operating characteristic (ROC) analysis. *J Eval Clin Pract* 12: 132-139.
38. Liu Z, Tan M, Jiang F (2009) Regularized F-measure maximization for feature selection and classification. *J Biomed Biotechnol* 2009: 617946.
39. Assumpcao JG, Ganazza MA, de Araujo M, Silva AS, Scrideli CA, et al. Detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia using a low-cost PCR strategy. *Pediatr Blood Cancer* 55: 1278-1286.
40. Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, Hutson A, McCann SE, et al. (2005) Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabonomics. *Int J Cancer* 113: 782-788.
41. Tiziani S, Lopes V, Gunther UL (2009) Early stage diagnosis of oral cancer using ¹H NMR-based metabolomics. *Neoplasia* 11: 269-276, 264p following 269.

42. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, et al. (2009) Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 457: 910-914.
43. Dickinson BC, Chang CJ (2011) Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* 7: 504-511.
44. Yin M-c, Cheng W-s (1998) Antioxidant Activity of Several Allium Members. *J Agric Food Chem* 46: 4097-4101.
45. Rose P, Whiteman M, Moore PK, Zhu YZ (2005) Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus Allium: the chemistry of potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep* 22: 351-368.
46. Ramoutar RR, Brumaghim JL (2010) Antioxidant and anticancer properties and mechanisms of inorganic selenium, oxo-sulfur, and oxo-selenium compounds. *Cell Biochem Biophys* 58: 1-23.
47. Telford JM, West GB (1961) Some effects of corticosteroids on the metabolism of histamine and 5-hydroxytryptamine in the rat. *Br J Pharmacol Chemother* 16: 360-368.
48. Szczepanek J, Styczynski J, Haus O, Tretyn A, Wysocki M (2011) Relapse of acute lymphoblastic leukemia in children in the context of microarray analyses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 59: 61-68.
49. Feng DD, Zhang H, Zhang P, Zheng YS, Zhang XJ, et al. (2011) Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *J Cell Mol Med* 15: 2164-2175.
50. Zuo Z, Jones D, Yao H, Thomas DA, O'Brien S, et al. (2010) A pathway-based gene signature correlates with therapeutic response in adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Mod Pathol* 23: 1524-1534.
51. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, et al. (2002) Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1: 133-143.
52. Cheok MH, Yang W, Pui CH, Downing JR, Cheng C, et al. (2003) Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells. *Nat Genet* 34: 85-90.

Supporting Information

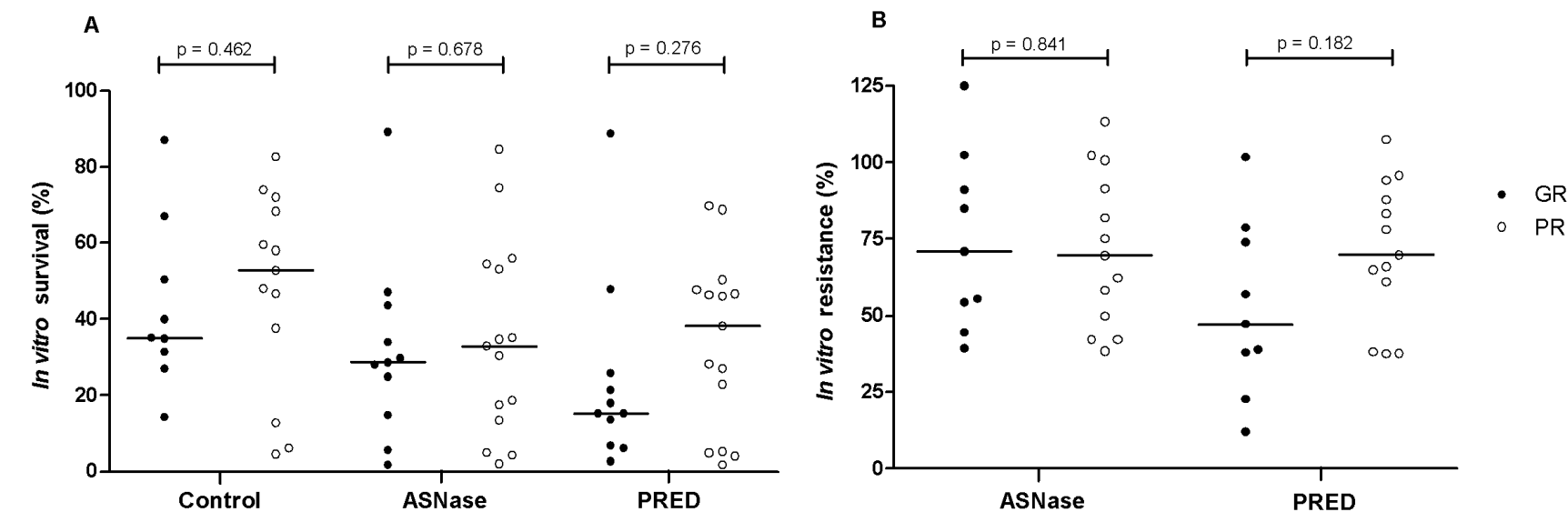


Figure S1. Differences in cell viability between samples of Good and Poor Responders. The difference between cell viability median of both groups were not statistically significant regardless the treatment. *In vitro* resistance (**B**) was calculated as the ratio of ASNase (or PRED) to Control *in vitro* survival values. P-values were calculated by the Mann-Whitney U test.

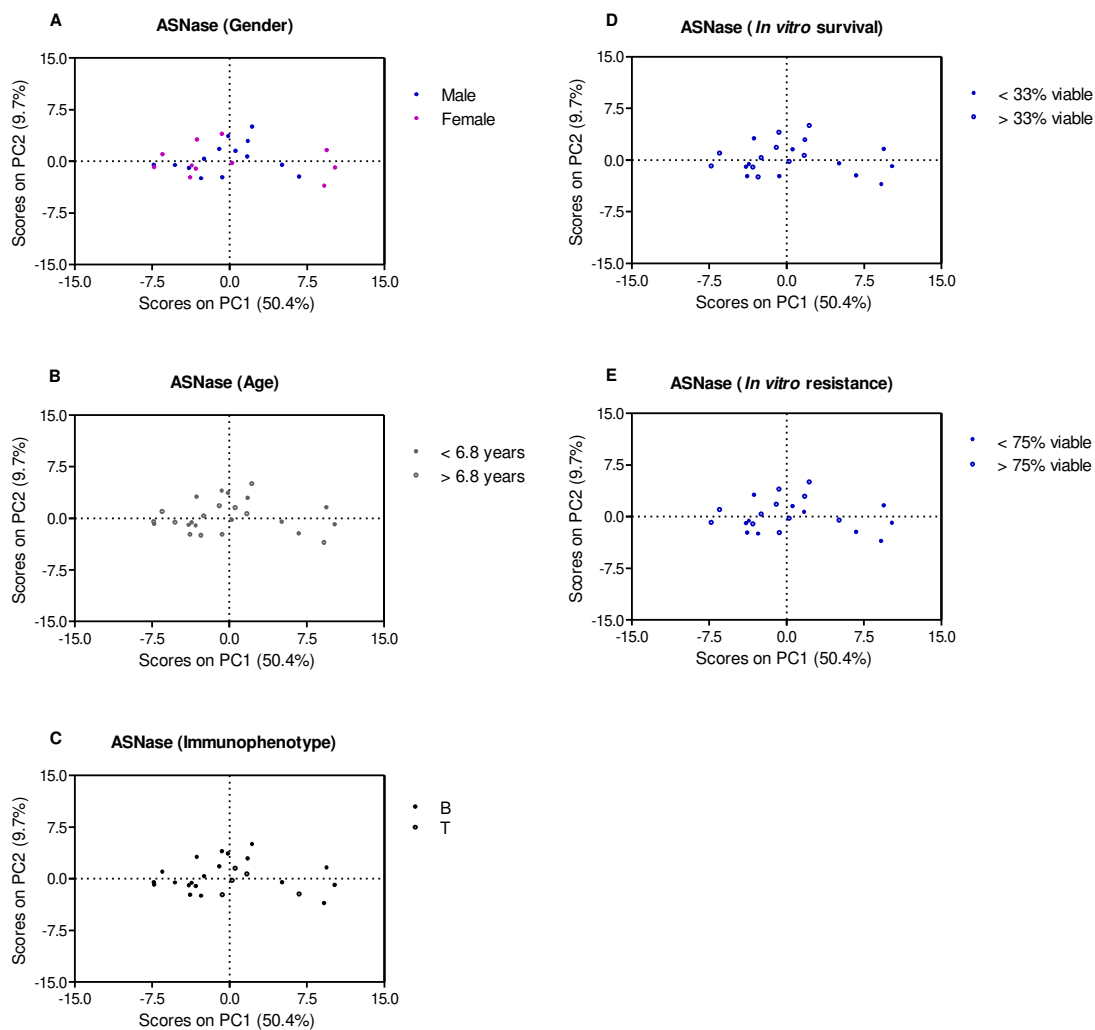


Figure S2. Unsupervised PCA analysis of ASNase-treated samples considering different classes. No clustering was observed in this unsupervised analysis using all metabolites quantified in conditioned culture medium of ASNase-treated cells. Continuous characteristics (age, *in vitro* cell survival and *in vitro* cell resistance to ASNase) were categorized using the median as the cut-off value. Three samples are missing in plots D and E as they lack survival analysis data.

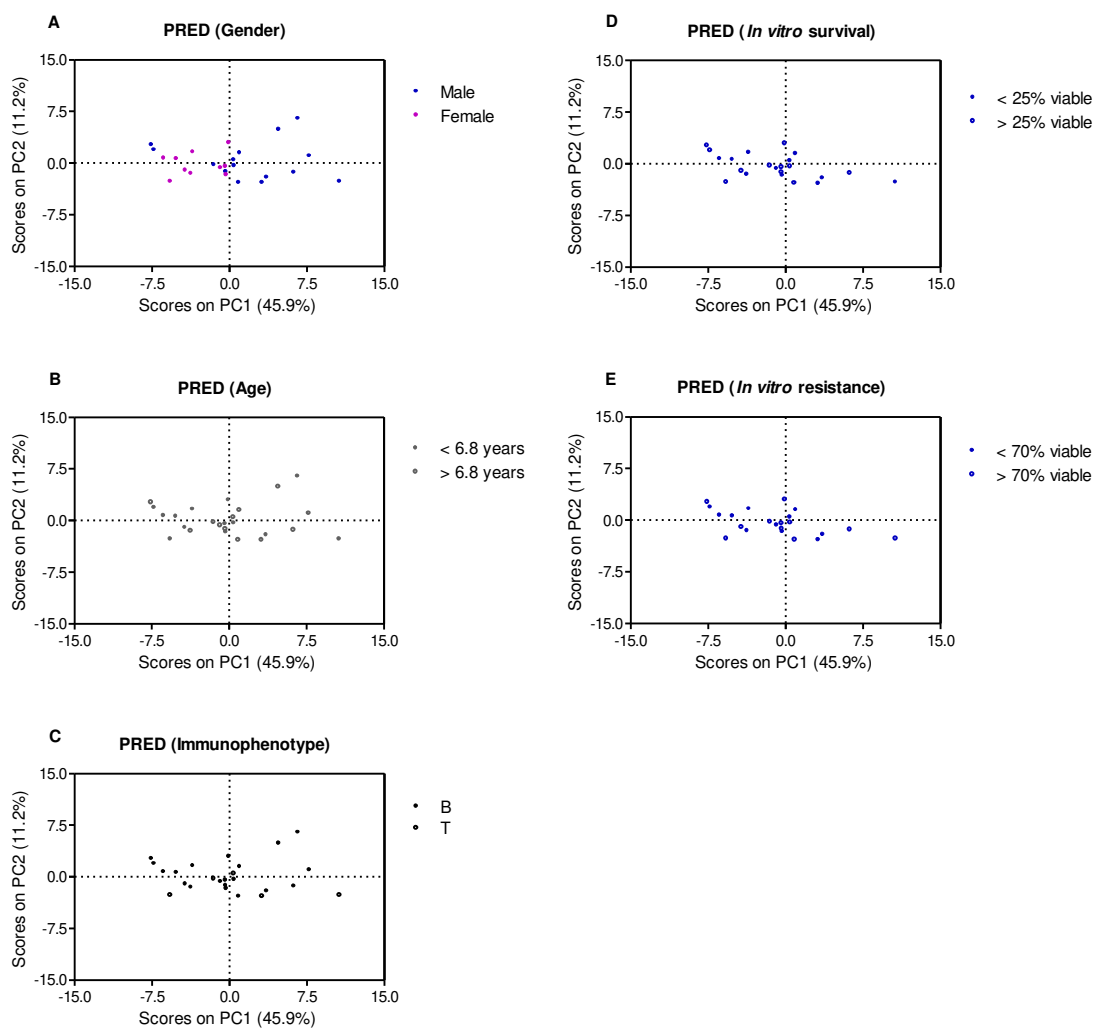


Figure S3. Unsupervised PCA analysis of PRED-treated samples considering different classes.

A subtle clustering related to gender is observed in this unsupervised analysis using all metabolites quantified in conditioned culture medium of PRED-treated cells. There was no clear separation with respect to all other characteristics. Continuous characteristics (age, *in vitro* cell survival and *in vitro* cell resistance to PRED) were categorized by using the median as the cut-off value. Three samples are missing in plots D and E as they lack survival analysis data.

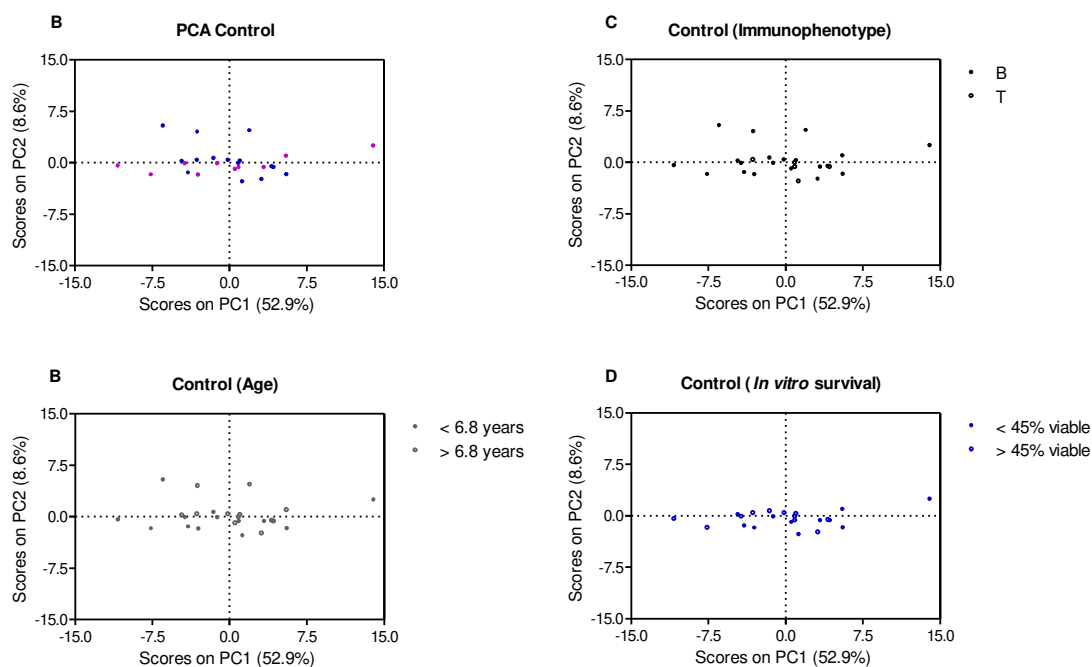


Figure S4. Unsupervised PCA analysis of control samples considering different classes. No clustering was observed in this unsupervised analysis using all metabolites quantified in conditioned culture medium of untreated cells (control). Continuous characteristics (age and *in vitro* cell survival) were categorized using the median as the cut-off value. Three samples are missing in plot D as they lack survival analysis data.

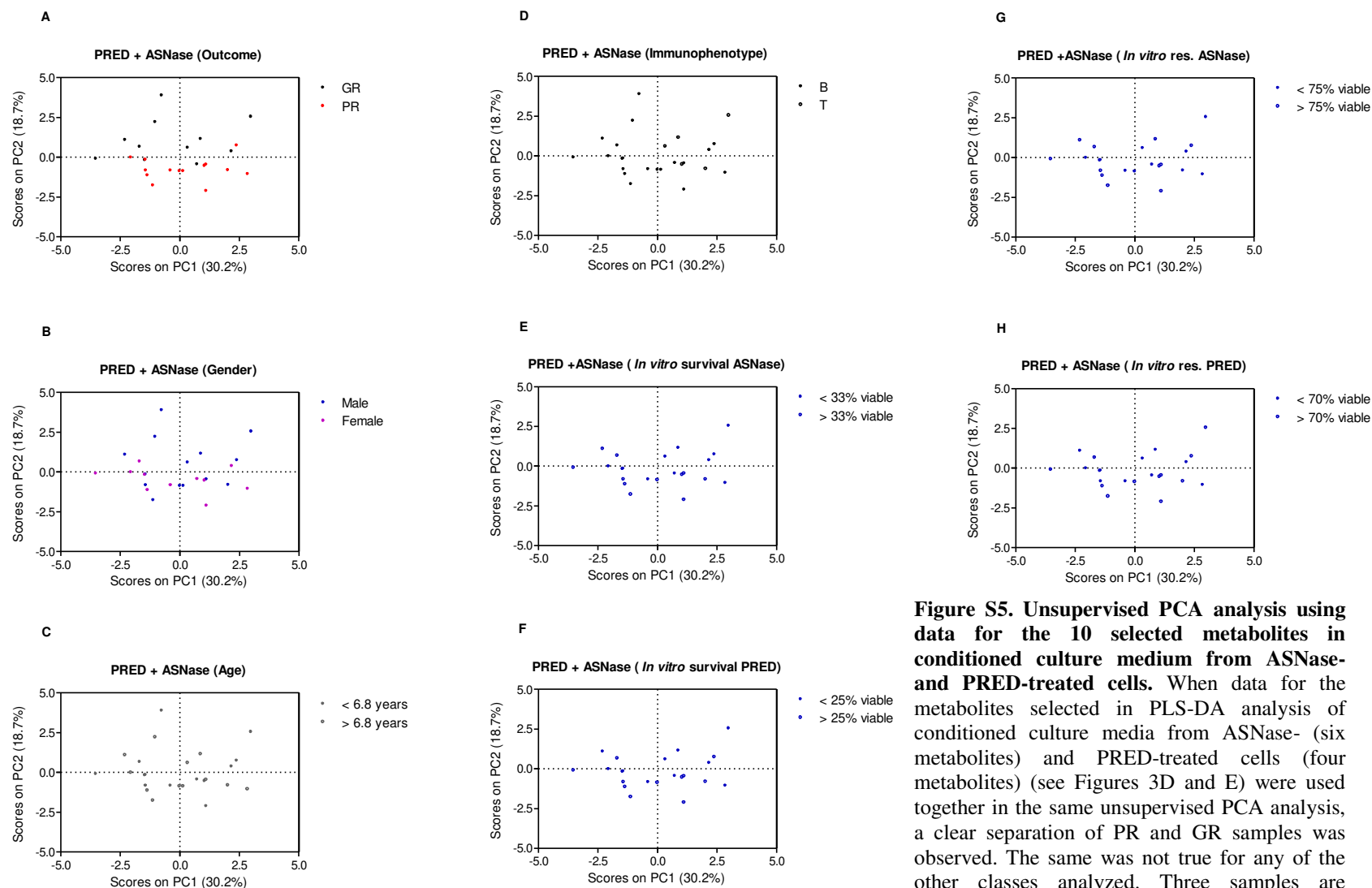


Figure S5. Unsupervised PCA analysis using data for the 10 selected metabolites in conditioned culture medium from ASNase- and PRED-treated cells. When data for the metabolites selected in PLS-DA analysis of conditioned culture media from ASNase- (six metabolites) and PRED-treated cells (four metabolites) (see Figures 3D and E) were used together in the same unsupervised PCA analysis, a clear separation of PR and GR samples was observed. The same was not true for any of the other classes analyzed. Three samples are missing in plots E, F, G, and H for they lack survival analysis data.

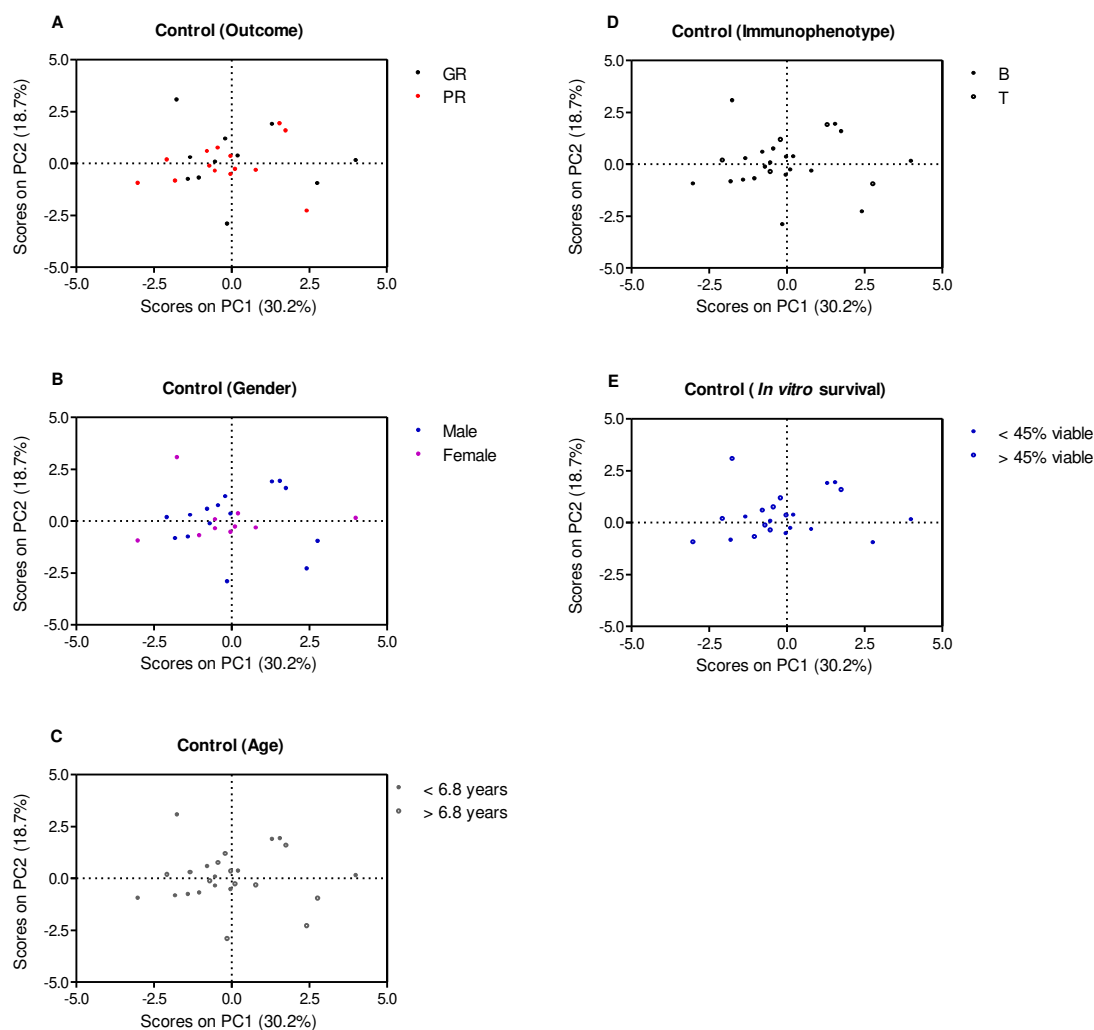


Figure S6. Unsupervised PCA analysis using metabolite concentrations found in the conditioned culture media of untreated cells (control) for those metabolites that discriminate PR and GR groups in ASNase- and PRED-treated cells. The following metabolites were selected: 2HB, dimethylamine, malonate, sarcosine, isobutyrate, isopropanol, histidine, isovalerate, and pyroglutamate – the same metabolites as used in the previous analysis (see Figure S5). No clear separation between classes was observed, in contrast to the clustering observed in the analysis of data from conditioned culture media of treated cells (Figure S5A). Three samples are missing in plot E as they lack survival analysis data.

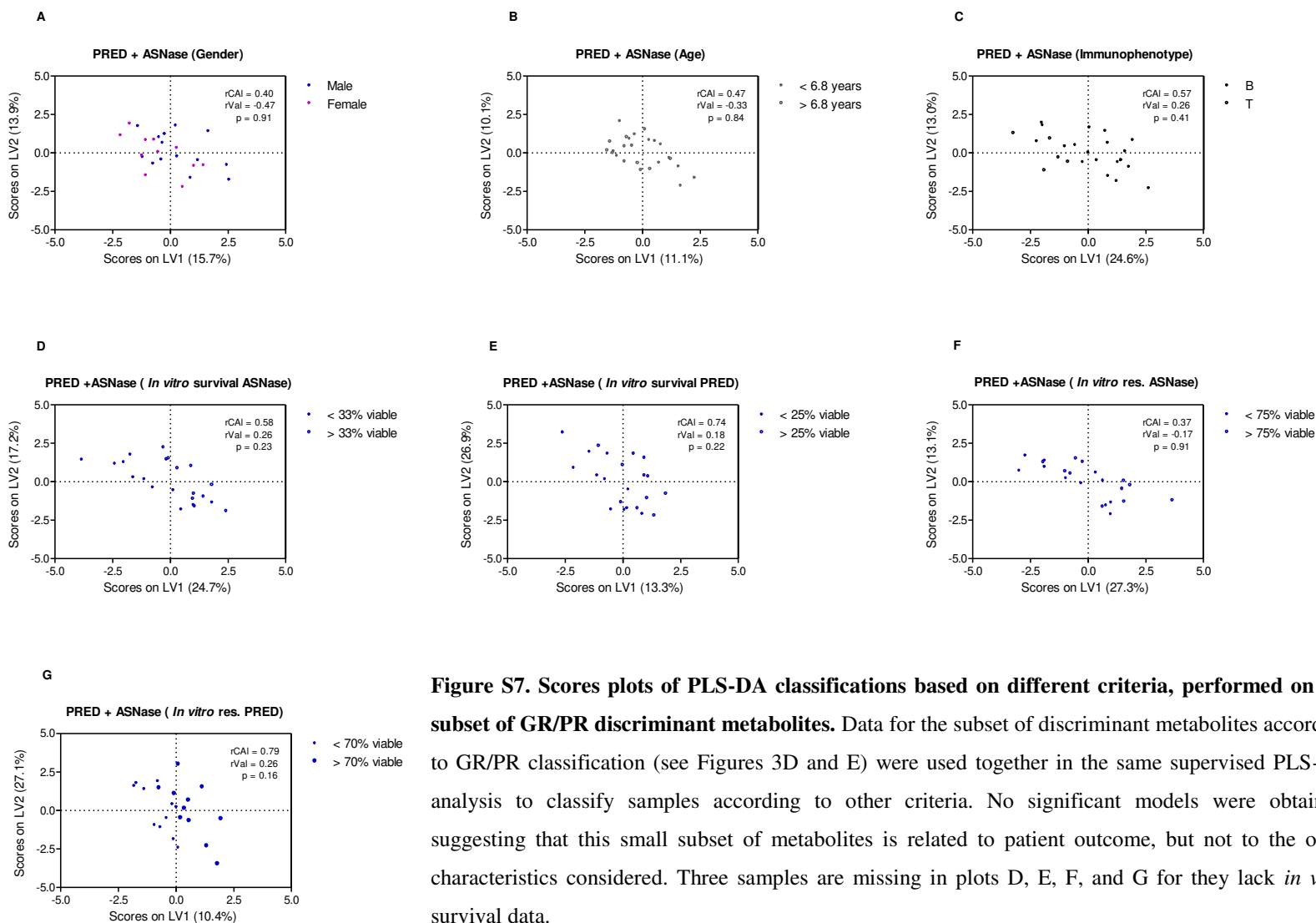


Figure S7. Scores plots of PLS-DA classifications based on different criteria, performed on the subset of GR/PR discriminant metabolites. Data for the subset of discriminant metabolites according to GR/PR classification (see Figures 3D and E) were used together in the same supervised PLS-DA analysis to classify samples according to other criteria. No significant models were obtained, suggesting that this small subset of metabolites is related to patient outcome, but not to the other characteristics considered. Three samples are missing in plots D, E, F, and G for they lack *in vitro* survival data.

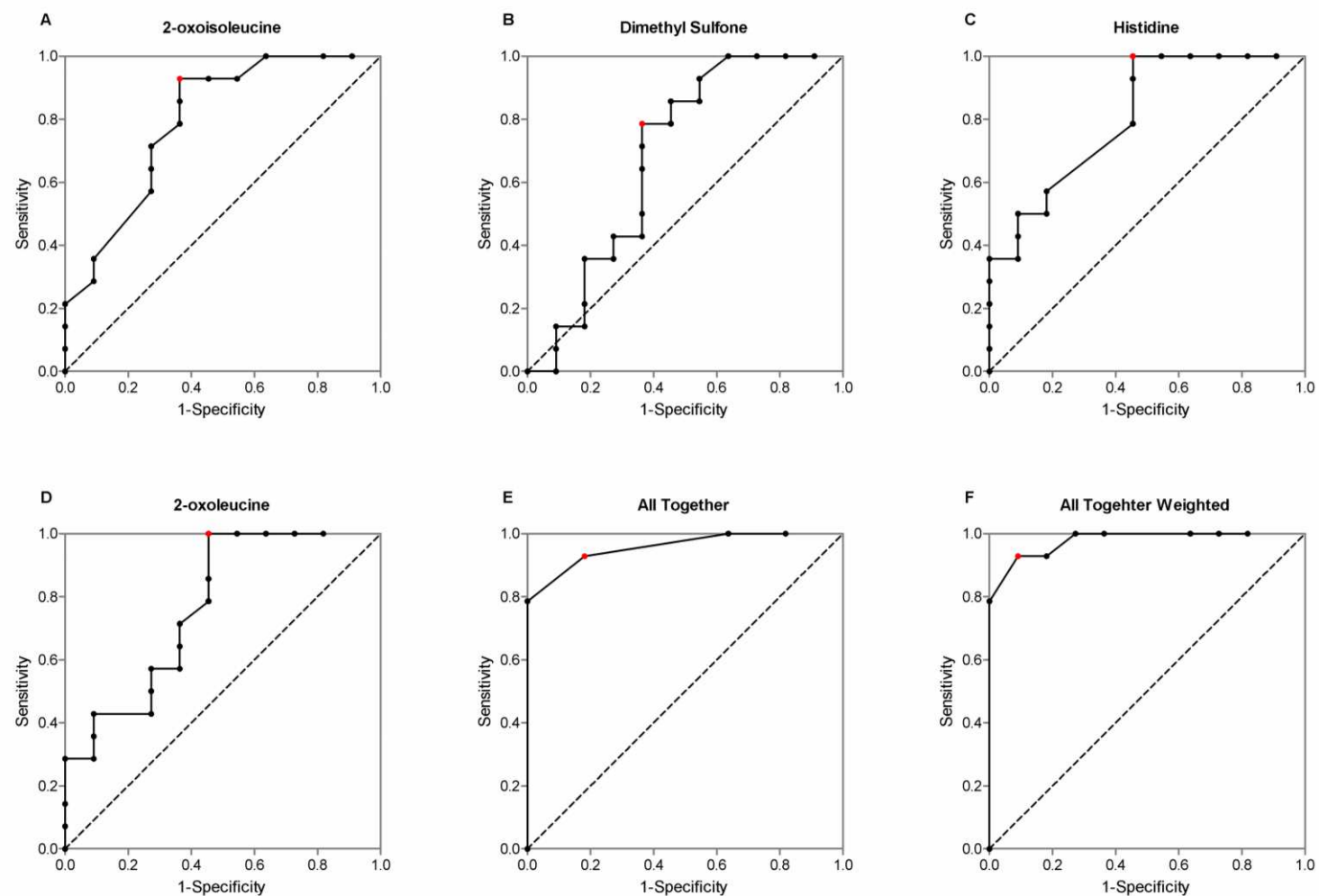


Figure S8. ROC analysis curves for metabolites that yielded the highest sensitivity and specificity values. Metabolites selected in PLS-DA analysis of conditioned culture media from ASNase- and PRED-treated cells that yielded an AUC (area under the curve) significantly ($P < 0.05$) greater than a random classifier (dashed line) were analyzed individually (A-D) and collectively (E and F). The best result was obtained with the scoring system that considered the F-measure for each metabolite (F). Red dots correspond to cut-off values.

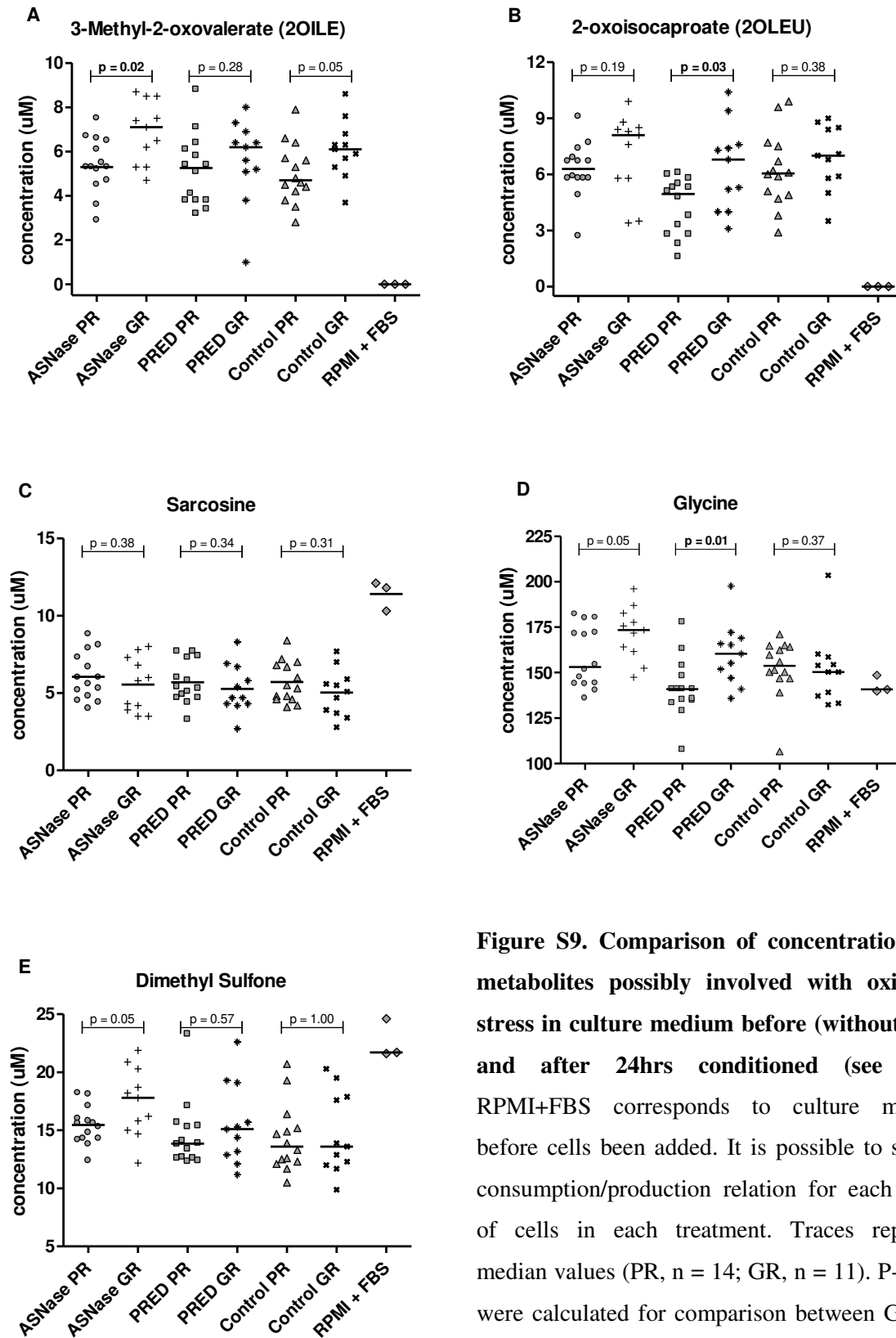


Figure S9. Comparison of concentrations for metabolites possibly involved with oxidative stress in culture medium before (without cells) and after 24hrs conditioned (see text). RPMI+FBS corresponds to culture medium before cells been added. It is possible to see the consumption/production relation for each group of cells in each treatment. Traces represent median values (PR, $n = 14$; GR, $n = 11$). P-values were calculated for comparison between GR and PR groups by the Mann-Whitney U test.

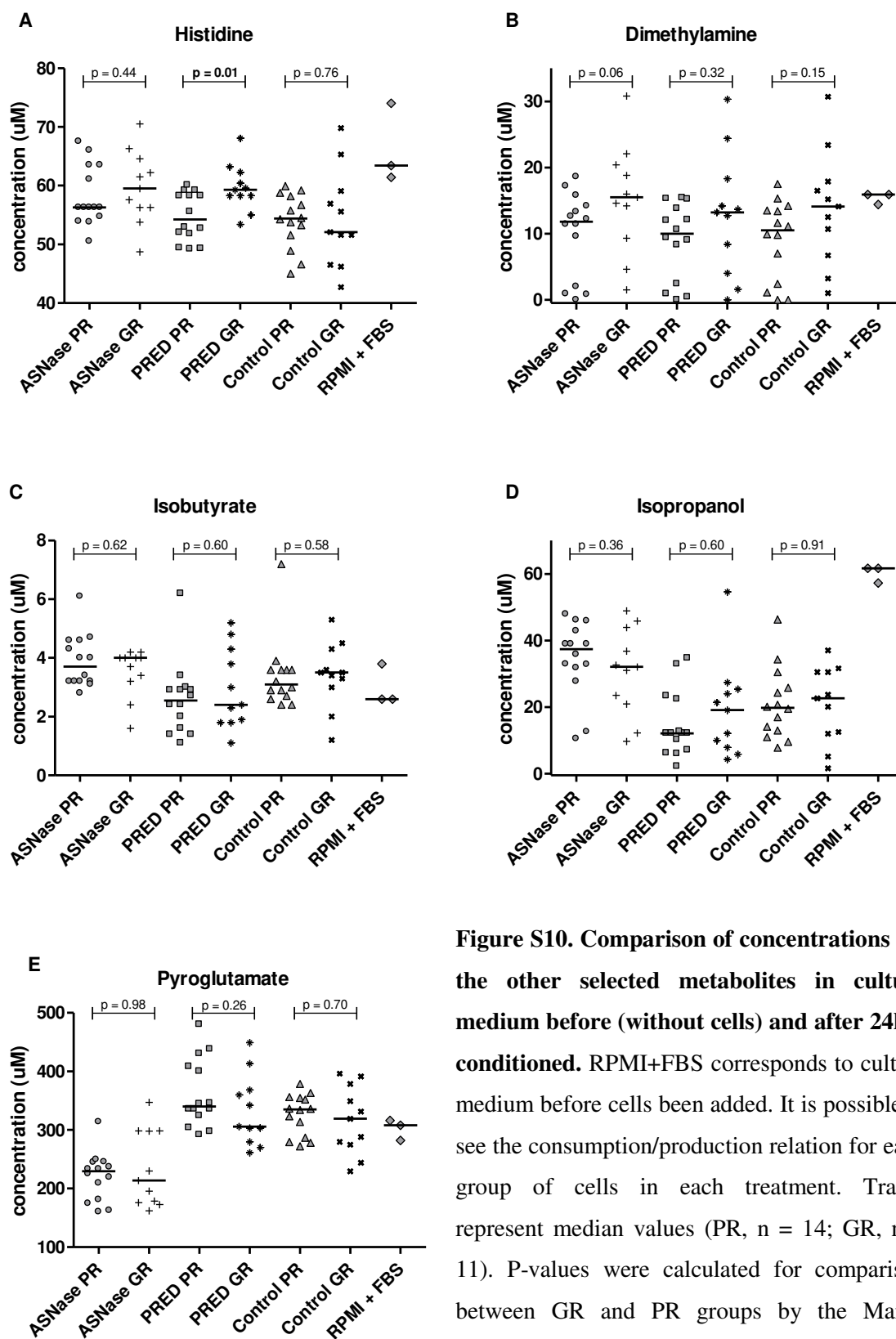


Figure S10. Comparison of concentrations for the other selected metabolites in culture medium before (without cells) and after 24hrs conditioned. RPMI+FBS corresponds to culture medium before cells been added. It is possible to see the consumption/production relation for each group of cells in each treatment. Traces represent median values (PR, n = 14; GR, n = 11). P-values were calculated for comparison between GR and PR groups by the Mann-Whitney U test.

Table S1. Primary ALL cells viability after 24 hrs in culture, as evaluated by Annexin V / Propidium iodide staining followed by Flow Cytometry Analysis.

Patient	Diagnosis date	<i>In vitro</i> survival (%)			<i>In vitro</i> resistance * (%)	
		Control	ASNase	PRED	ASNase	PRED
1§	02/28/99	-	1.62	2.71	-	-
2	05/30/00	71.99	30.33	27.05	42.1	37.6
3	07/27/00	58.04	53.07	38.25	91.4	65.9
4	08/30/00	73.95	74.49	69.67	100.7	94.2
5	09/21/00	31.43	28.59	17.91	91.0	57.0
6	11/08/00	66.90	29.73	15.19	44.4	22.7
7	12/07/00	52.73	32.87	46.27	62.3	87.7
8	01/23/01	37.65	18.70	22.94	49.7	60.9
9	01/21/02	34.84	43.56	25.76	125.0	73.9
10§	05/15/02	-	47.11	47.84	-	-
11§	06/06/02	-	17.46	28.10	-	-
12§	01/17/05	-	13.45	5.20	-	-
13	08/31/05	6.03	4.19	3.92	69.5	65.0
14	10/03/06	40.01	33.96	15.19	84.9	38.0
15	12/27/06	4.51	1.90	1.69	42.1	37.5
16	04/09/07	46.73	35.09	50.25	75.1	107.5
17	07/23/07	12.73	4.89	4.86	38.4	38.2
18	09/19/07	50.37	27.90	6.06	55.4	12.0
19	09/26/07	82.51	84.42	68.65	102.3	83.2
20	10/16/07	59.60	34.66	46.57	58.2	78.1
21	11/06/07	87.01	89.07	88.57	102.4	101.8
22	11/12/07	27.06	14.73	21.32	54.4	78.8
23	11/19/07	35.08	24.87	13.61	70.9	38.8
24	12/09/09	68.32	55.86	47.66	81.8	69.8
25	12/29/09	14.37	5.64	6.78	39.2	47.2
26	01/06/10	48.02	54.43	45.94	113.3	95.7
27 ⁺	03/11/10	-	-	-	-	-
28 ⁺	05/05/10	-	-	-	-	-
29 ⁺	05/13/10	-	-	-	-	-

* Ratio of ASNase (or PRED) to Control *in vitro* survival values.

§ Patients excluded from initial multivariate analysis due to the lack of sufficient cells for the control experiment. These samples were treated with ASNase and PRED and data obtained were used as an independent validation set.

⁺Samples without cell viability data, but included in multivariate analysis.

Table S2. Metabolite concentrations (μM) in 24 hrs conditioned culture media of primary ALL cells from Good (GR) versus Poor Responder (PR) patients.

Metabolite	Control			ASNase			PRED		
	GR (n=11)	PR (n=14)	P-value	GR (n=11)	PR (n=14)	P-value	GR (n=11)	PR (n=14)	P-value
3-Methyl-2-oxovalerate	6.1 ± 1.3	5.0 ± 1.4	0.05	6.9 ± 1.4	5.4 ± 1.2	<0.05	5.6 ± 1.9	5.2 ± 1.6	0.26
2-Methylglutarate	4.1 ± 1.0	4.1 ± 0.5	0.58	4.4 ± 0.6	4.4 ± 1.0	0.74	3.9 ± 0.7	4.0 ± 0.5	0.62
2-Oxoglutarate	4.2 ± 1.2	4.0 ± 0.8	0.35	15.0 ± 4.0	13.4 ± 1.9	0.07	5.0 ± 1.4	4.4 ± 1.4	0.31
2-oxoisocaproate	6.9 ± 1.7	6.2 ± 2.0	0.37	7.1 ± 2.2	6.3 ± 1.5	0.19	6.4 ± 2.3	4.3 ± 1.5	<0.05
Acetate	22.8 ± 6.5	24.1 ± 4.1	0.62	28.6 ± 7.6	24.2 ± 6.8	0.27	27.3 ± 7.7	26.5 ± 6.0	0.85
Acetone	3.2 ± 2.0	2.6 ± 1.4	0.31	4.0 ± 1.4	3.4 ± 1.3	0.34	4.5 ± 2.4	4.9 ± 2.9	0.96
Alanine	119.1 ± 17.5	120.9 ± 11.8	0.44	149.3 ± 17.7	140.6 ± 14.5	0.17	124.2 ± 11.4	117.9 ± 9.7	0.09
Arginine	526.6 ± 91.7	547.6 ± 56.5	0.41	552.8 ± 71.4	539.3 ± 57.6	0.48	528.7 ± 46.4	509.9 ± 39.8	0.25
Asparagine	241.7 ± 34.4	242.6 ± 20.5	0.74	0.0	0.0	1.00	250.5 ± 25.1	233.6 ± 20.2	<0.05
Aspartate	105.7 ± 16.6	108.4 ± 10.5	0.31	316.9 ± 39.4	307.0 ± 34.5	0.53	111.1 ± 7.7	109.2 ± 9.1	0.51
Choline	19.1 ± 2.9	19.3 ± 2.0	0.60	21.4 ± 3.3	21.6 ± 2.4	0.58	21.7 ± 2.1	21.2 ± 1.6	0.78
Citrate	25.2 ± 3.2	24.9 ± 2.3	0.85	27.5 ± 4.8	25.8 ± 2.7	0.14	25.0 ± 4.6	22.6 ± 4.8	0.55
Creatine	24.1 ± 3.9	24.4 ± 3.6	0.81	26.5 ± 3.9	26.2 ± 4.5	0.98	23.9 ± 3.1	23.7 ± 3.2	0.85
Creatinine	20.0 ± 3.4	20.0 ± 2.3	0.93	22.0 ± 2.4	21.2 ± 2.1	0.51	21.4 ± 2.9	19.0 ± 2.6	0.05
Cystine	112.6 ± 15.0	115.8 ± 13.3	0.55	133.8 ± 20.1	125.7 ± 14.4	0.25	126.8 ± 15.3	116.9 ± 7.4	0.08
Dihydrothymine	12.7 ± 4.3	14.2 ± 3.4	0.57	15.4 ± 3.1	15.2 ± 1.7	0.68	9.1 ± 3.4	8.8 ± 2.4	0.93
Dimethylamine	13.8 ± 8.6	9.1 ± 6.0	0.14	15.3 ± 8.2	10.0 ± 6.4	0.06	12.8 ± 9.3	8.9 ± 5.7	0.32
Dimethylsulfone	14.7 ± 3.5	14.3 ± 2.9	0.98	17.4 ± 3.0	15.4 ± 1.6	0.05	15.5 ± 3.5	14.6 ± 2.9	0.57
Ethanolamine	19.7 ± 12.4	18.0 ± 14.7	0.58	22.8 ± 13.3	24.2 ± 17.3	0.74	15.0 ± 13.9	17.4 ± 12.5	0.41
Formate	27.8 ± 7.2	24.6 ± 4.5	0.26	32.8 ± 8.3	27.4 ± 6.7	0.06	29.7 ± 10.0	23.9 ± 5.2	0.12
Fructose	414.5 ± 64.5	416.1 ± 46.2	0.47	398.4 ± 59.0	383.0 ± 57.7	0.46	402.8 ± 36.1	371.5 ± 34.5	0.06
Glucose	6497.7 ± 991.3	6586.6 ± 688.5	0.44	7065.8 ± 865.9	6863.8 ± 649.5	0.57	6744.1 ± 561.0	6461.4 ± 491.7	0.23
Glutamate	235.7 ± 54.9	234.5 ± 42.6	0.96	1558.7 ± 191.6	1508.2 ± 182.4	0.58	248.7 ± 48.0	229.4 ± 47.8	0.35
Glutamine	902.2 ± 146.7	916.0 ± 105.9	0.31	0.0	0.0	1.00	907.8 ± 84.9	827.4 ± 74.0	<0.05
Glycine	152.1 ± 19.8	152.5 ± 16.0	0.35	171.8 ± 14.6	158.4 ± 16.8	0.05	160.1 ± 17.1	141.6 ± 16.4	<0.05
Histidine	54.3 ± 8.2	54.0 ± 4.7	0.74	59.8 ± 6.1	58.3 ± 5.1	0.42	59.7 ± 4.0	54.7 ± 4.1	<0.05
Hydroxy-L-proline	116.9 ± 25.3	125.6 ± 22.5	0.58	116.5 ± 17.4	110.7 ± 11.3	0.37	117.3 ± 11.3	101.5 ± 16.1	<0.05
Hypoxanthine	9.1 ± 2.4	10.0 ± 2.4	0.34	11.6 ± 2.1	10.7 ± 2.3	0.13	11.0 ± 2.3	10.0 ± 2.1	0.38
Isobutyrate	3.4 ± 1.1	3.4 ± 1.2	0.56	3.5 ± 0.8	3.9 ± 0.9	0.60	2.9 ± 1.4	2.6 ± 1.3	0.60
Isoleucine	245.5 ± 34.4	248.6 ± 24.1	0.37	266.6 ± 33.8	256.1 ± 27.8	0.37	253.0 ± 20.6	246.8 ± 17.3	0.68
Isopropanol	20.7 ± 11.6	21.0 ± 10.7	0.89	30.7 ± 13.1	34.5 ± 11.4	0.34	19.3 ± 14.3	14.7 ± 9.9	0.60
Lactate	1930.7 ± 202.0	1971.4 ± 287.4	0.48	2225.7 ± 276.7	2091.7 ± 359.1	0.46	1930.0 ± 241.5	1771.3 ± 196.0	0.15
Leucine	217.6 ± 32.7	219.5 ± 24.3	0.64	231.2 ± 31.4	224.0 ± 25.2	0.46	219.1 ± 21.2	211.6 ± 16.4	0.49
Lysine	127.8 ± 16.3	128.1 ± 12.0	0.53	141.3 ± 16.3	136.6 ± 14.0	0.35	132.7 ± 12.4	129.2 ± 9.9	0.37
Methanol	42.6 ± 21.3	34.2 ± 22.8	0.18	60.4 ± 31.1	55.3 ± 25.9	0.81	59.8 ± 30.7	49.4 ± 13.8	0.53
Methionine	64.4 ± 10.1	66.3 ± 5.3	0.15	78.7 ± 9.0	73.9 ± 6.1	0.15	71.7 ± 6.9	66.6 ± 4.9	0.07
myo-Inositol	190.6 ± 26.6	190.7 ± 17.7	0.51	200.5 ± 21.3	188.0 ± 21.5	0.11	192.9 ± 15.8	185.6 ± 13.3	0.28
Ornithine	90.6 ± 24.3	92.8 ± 21.4	0.78	107.0 ± 31.6	104.8 ± 23.3	0.78	89.0 ± 25.1	88.7 ± 19.1	0.83
Pantothenate	5.0 ± 0.7	4.9 ± 0.6	0.74	4.7 ± 0.9	4.4 ± 0.6	0.27	5.5 ± 0.8	5.4 ± 0.6	0.52
Phenylalanine	77.0 ± 8.9	77.2 ± 6.4	0.66	83.2 ± 9.3	80.9 ± 8.5	0.66	82.0 ± 6.5	78.8 ± 6.3	0.13
Proline	122.4 ± 14.7	125.3 ± 12.2	0.44	123.3 ± 24.3	119.9 ± 16.1	0.81	124.0 ± 11.6	117.2 ± 14.0	0.10
Pyridoxine	4.7 ± 1.8	5.4 ± 0.9	0.34	5.4 ± 0.9	5.4 ± 0.8	0.80	3.9 ± 1.6	4.2 ± 0.9	0.87
Pyroglutamate	316.6 ± 58.1	326.1 ± 34.9	0.68	233.8 ± 65.1	220.7 ± 41.3	0.96	332.3 ± 60.3	362.3 ± 58.4	0.26
Pyruvate	56.6 ± 20.4	53.7 ± 21.8	0.58	40.8 ± 11.8	41.2 ± 19.7	0.74	55.3 ± 16.4	41.8 ± 18.3	0.08
Sarcosine	5.0 ± 1.5	5.7 ± 1.3	0.30	5.6 ± 1.7	6.0 ± 1.5	0.37	5.3 ± 1.6	5.7 ± 1.4	0.34
Serine	154.0 ± 21.8	156.8 ± 23.3	0.55	157.5 ± 12.9	146.9 ± 15.9	0.09	150.3 ± 17.0	145.7 ± 18.4	0.38
Succinate	57.5 ± 9.3	56.3 ± 7.1	0.60	59.6 ± 8.3	58.4 ± 6.6	0.58	62.6 ± 8.6	55.5 ± 13.0	0.12
Threonine	96.9 ± 15.0	99.7 ± 10.5	0.35	105.2 ± 9.7	98.8 ± 9.9	0.14	98.6 ± 7.1	92.4 ± 16.0	0.29
Tyrosine	105.9 ± 14.6	107.4 ± 10.1	0.27	115.1 ± 12.9	110.3 ± 12.1	0.18	110.4 ± 8.2	106.6 ± 7.7	0.15
Valine	120.2 ± 17.0	121.6 ± 11.2	0.44	130.9 ± 15.8	126.2 ± 13.3	0.41	123.2 ± 9.6	119.4 ± 8.5	0.30

Data correspond to average and standard deviation. P-values were calculated by Mann-Whitney U test.

Gender related differences on the *in vitro* response of primary acute lymphoblastic leukemia cells to prednisolone

Carolina Pereira de Souza Melo^{1,2}, Rafael Renatino Canevarolo^{1,2}, Silvia Regina Brandalise^{1,3}, Jose Andres Yunes^{1,4,5*}, Ana Carolina Zeri^{2,5*}

¹Laboratório de Biologia Molecular, Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brazil; ²Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, Brazil;

³Serviço de Hematologia/Oncologia Pediátrica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil;

⁴Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil; ⁵These authors jointly coordinated the work.

Abstract

Male sex has generally been associated with a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia (ALL), what in a first moment was explained by the existence of sanctuary sites, like testicles. But, differences related to gender found in pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) properties of some drugs raised the hypothesis of sex influence in drug efficacy. We observed an unexpected sex-related effect in the conditioned culture media of ALL cells under *in vitro* prednisolone treatment, but not in media from cells under control conditions or asparaginase treatment. Through Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analysis of cells culture medium, we found that cells from female patients consume more arginine and less ornithine than cells from male patients, what can be related to downregulation of the transcription factor *c-Myc*. Importantly, cell viability assays showed that these gender-related differences cannot be attributed to differences in *in vitro* cell survival or PRED resistance after culture period. Our data may contribute to the understanding of the mechanisms behind differences between genders in ALL drug metabolism.

Introduction

Male sex has generally been associated with an inferior prognosis, compared to females, in acute lymphoblastic leukemia (ALL) [1]. This is one of the reasons for the use of longer maintenance phase for boys but not for girls in some protocols [2]. One plausible explanation for sex-related outcome differences first came with a hypothesis based on an anatomical rather than physiological difference. Testicles, as CNS, are considered ‘sanctuary sites’ where leukemic cells can refuge from the action of chemotherapy, being relapse rates five times higher among patients with occult testicular leukemia (TL) at diagnosis than in those with negative biopsies [3].

The influence of sex in pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of drugs is a known phenomenon, though not always well understood [4]. Magee *et al.* mention a range of examples of how drug metabolism can be affected by hormone variation in women, besides some cases of marked sex differences in drug efficacy [5]. The same authors reported PK/PD differences related to sex and race in healthy adults after single oral doses of prednisolone (PRED), a corticosteroid drug employed in the treatment of ALL as well in a wide range of inflammatory and auto-immune conditions. The clinical significance of these sex differences remains to be determined, especially for the administration of drugs that have a narrow therapeutic range [4].

Here, we report a case of unexpected sex-related effect observed while conducting a study on the metabolomics of ALL resistance to therapy (Melo *et al.*, in preparation). Sex-related differences were observed in the conditioned culture media of ALL cells under *in vitro* PRED treatment, but not in media from cells under control conditions or asparaginase (ASNase) treatment. To our knowledge, this is the first work to show sex differences in PRED response at the ALL cellular level.

Methods

Leukemia cell samples

A total of 25 patients' samples with at least 84% of ALL blasts (median 94%) were obtained from a biobank of post-ficoll mononuclear cells from bone marrow aspirates of children with newly diagnosed ALL, treated between 1999 and 2010, at Centro Infantil Boldrini, according to the GBTLI ALL-99 protocol [6,7]. Once patients with a higher white blood cell (WBC) count at diagnosis were more likely to have cryopreserved cell samples, 23 of the 25 samples were from patients classified in the high risk group. Written informed consent has been given by all patients participant of the study. Experimental procedures were approved by the ethics and research committee of the Centro Infantil Boldrini, Campinas, Brazil, in accordance with institutional guidelines.

Culture of leukemia cells

Frozen ALL cells were thawed at 37°C and washed with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Cultilab). Apoptotic and dead cells were immunomagnetically removed using the Dead Cell Removal kit (Miltenyi Biotec, Germany), according to the manufacturer's instructions. Six million primary ALL cells were cultured at 2×10^6 cells/ml in the absence (control) or presence of ASNase (0.8 IU/ml; Merck Sharp & Dohme) or

PRED (1 µg/ml; Sigma-Aldrich), for 24 hrs, in RPMI 1640 medium (Cultilab) supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (PS, Sigma-Aldrich), at 37°C and 5% CO₂. The concentrations of ASNase and PRED correspond to a dose in between the cut-off values previously described to discriminate *in vitro* sensitivity and resistance of primary ALL cells [8]. After the incubation period, cells were pelleted by centrifugation at 1,200 rpm for 10 minutes and the supernatant (conditioned culture medium) was aliquoted and kept frozen at -70°C for NMR analysis.

Cell viability assay

To address the possible influence of cell viability on the metabolite profile of conditioned culture media, apoptotic and dead cells were quantified using the Annexin-V / Propidium Iodide (PI, Invitrogen) double staining method. Briefly, 200,000 ALL cells were washed with PBS, resuspended in 100 µl of Annexin-V Binding Buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) plus 5 µl of Annexin-V FITC (Invitrogen) and incubated for 15 minutes at room temperature in the dark. Then, PI (to a final concentration of 5 µg/ml) and 400 µl of Annexin-V Binding Buffer were added, and 10,000 cells were analyzed using a BD FACSCalibur Flow Cytometry System (BD Biosciences, California, USA).

In vitro cell resistance to PRED or ASNase was calculated by the expression:

$$\% \text{ Resistance} = \% \text{ Survival with drug} / \% \text{ Survival control}$$

In some cases, where *in vitro* survival without drug was too low, no cells were left to allow measuring the effect of drug treatment. We did not remove those cases from the analysis because any cut off point for control survival would be arbitrarily chosen since distribution analysis of control survival showed no clear categories, but a continuous pattern.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) data acquisition

After being filtered at room temperature through a Microcon YM-3 column (Millipore, Massachusetts, USA), 480 µl of conditioned culture medium was mixed with 60 µl of deuterium oxide (D₂O, 99.9%; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Massachusetts, USA) and 60 µl of a 5 mM solution of the internal reference sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Massachusetts, USA) in 100 mM phosphate buffer, pH 7.0. Next, 550 µl of sample was added to a 5 mm NMR tube and NMR acquisition was performed immediately. ¹H-NMR spectra of samples were acquired using a Varian Inova NMR spectrometer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) equipped with a triple resonance probe and

operating at a ^1H resonance frequency of 500 MHz and constant temperature of 298 K (25°C). A total of 256 free induction decays (FIDs) were collected with 32-k data points over a spectral width of 16 ppm. A 1.5-s relaxation delay was incorporated between FIDs, during which a continual water presaturation radio frequency (RF) field was applied. Spectral phase and baseline corrections, as well as the identification and quantification of metabolites present in samples, were performed using the Chenomx NMR Suite 4.6 software (Chenomx Inc., Edmonton, Canada).

Multivariate analysis

Unsupervised Principal Component Analysis (PCA) and supervised Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) of metabolite concentrations were performed using the Pirouette 4.0 software (Infometrix Inc., Washington, USA). Data were auto-scaled and PLS-DA models were evaluated using correlation coefficients of calibration (rCal) and validation (rVal), which were calculated by internal cross-validation. Classification significance was evaluated by permutation tests. P -value < 0.05 was considered to be significant.

Results and Discussion

This study included samples from children with newly diagnosed ALL who were treated at a single institution according to the Brazilian GBTLI ALL-99 protocol [6,7]. Patients' characteristics are shown in Table 1.

Table 1. Patients' characteristics

	Male n = 15	Female n = 10
Age (years)		
< 1	1	0
1 – 5	3	3
6 – 10	3	5
> 10	8	2
Mean	10 ± 6	6 ± 4
WBC at diagnosis ($\times 10^3/\text{L}$)		
< 50	6	4
50 – 100	5	2
> 100	4	4
Immunophenotype		
precursor B-cell	12	9
T	3	1
Risk Classification*		
Low	1	1
High	14	9

* Risk classification according to GBTLI ALL-99 criteria [6,7].

Patients' cells were cultured for 24hrs under three different conditions: with ASNase, with PRED, and without drug (control). Metabolic profiles of conditioned culture media were generated using ^1H -NMR spectroscopy. Spectra were processed using the Chenomx software, which allowed us to identify and quantify 50 compounds. The details of the metabolic profiles analyzed with respect to treatment outcome of the corresponding patients will be published elsewhere (Melo et al., in preparation).

Unsupervised PCA analysis of data for the 50 metabolites obtained from the control, ASNase or PRED assays showed a subtle clustering associated with gender in the case of PRED-treated cells (Figure 1). None of the other variables analyzed showed any indication of group clustering in the unsupervised PCA analysis (Figure S1). As shown in Figure 2, gender-related differences evoked by the PRED treatment cannot be attributed to differences in cell viability or in vitro resistance (see methods) to PRED after the 24 hrs culture period.

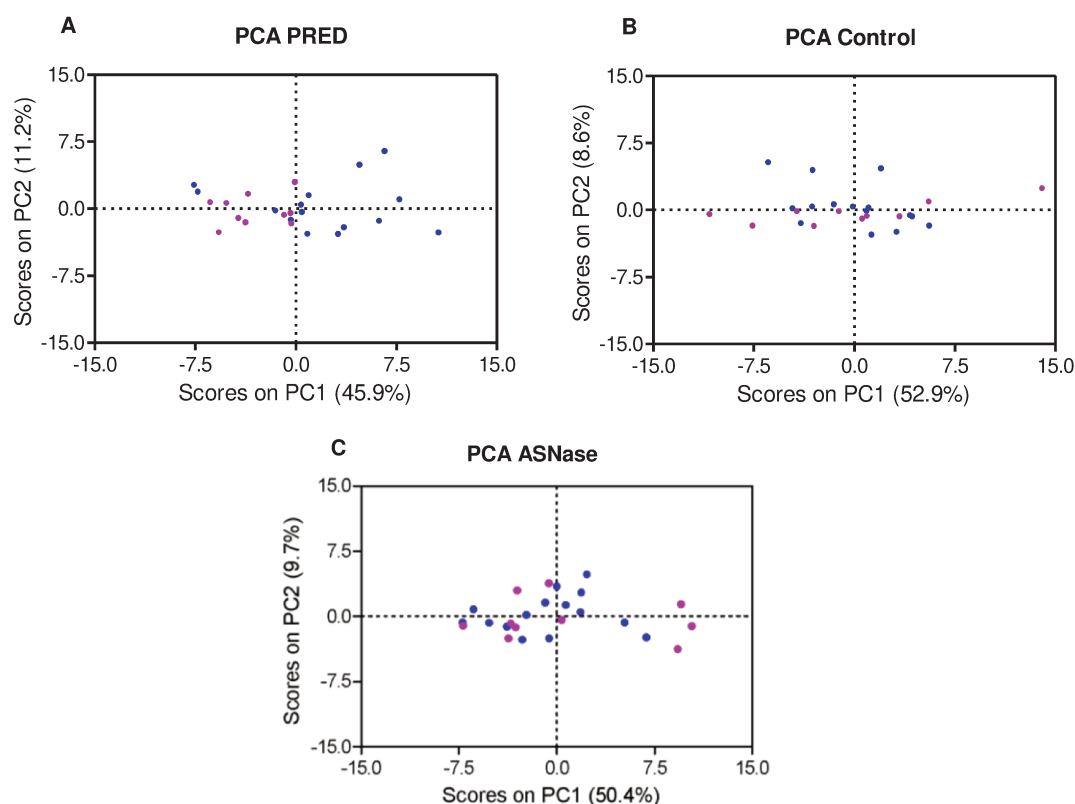


Figure 1. Scores plots of PCA analyses using all metabolites quantified in conditioned culture medium. In this unsupervised analysis, a subtle clustering between males (blue) and females (pink) can be seen using data from PRED-treated cells culture medium (A), the opposite observed when data from control (untreated) (B) or ASNase treated cells are used (C).

To identify metabolite patterns in the conditioned culture media that differed among the two groups (male versus female) we performed a supervised PLS-DA analysis using the same data. Scores plots of the first two latent variables (LV) showed that the profile using the 50 metabolites from PRED-treated culture media allowed a clearer separation between both groups (Figures 3). Weights plots obtained using the same two LVs allowed the selection of the metabolites primarily responsible for the observed clusterings after PRED treatment. As shown in Figures 3B, the conditioned culture media from male ALL samples presented higher levels of arginine, pyridoxine and acetone and lower levels of ornithine. When only these metabolites were used in a new PLS-DA analysis, we obtained a significant clustering ($P < 0.01$) related to gender (Figure 3C).

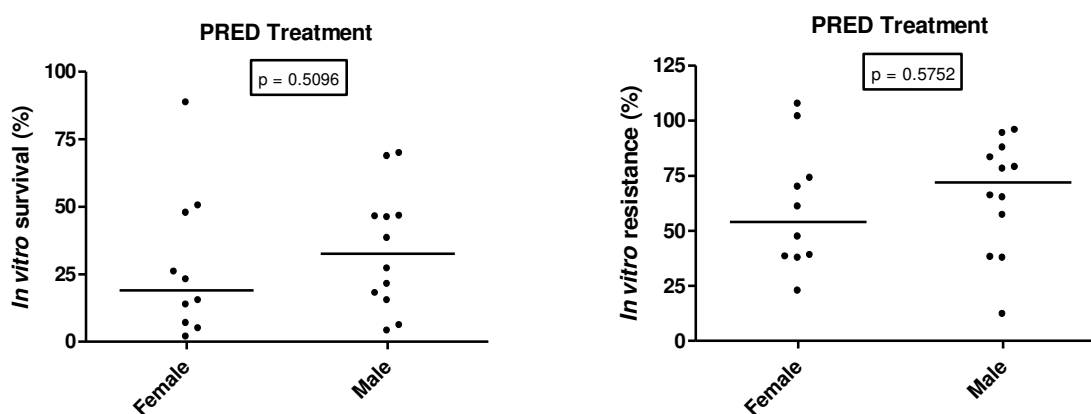


Figure 2. Differences in cell viability according to gender after PRED treatment. The difference between cell viability median of both groups were not statistically significant. *In vitro* resistance was calculated as the ratio of ASNase (or PRED) to Control *in vitro* survival values. P-values were calculated by the Mann-Whitney U test. Three samples are missing in male group as they lack survival analysis data.

Glucocorticoid treatment of ALL cells downregulates *c-Myc* [9-11], a transcription factor with controversial role in glucocorticoid induction of apoptosis in ALL cells (reviewed in Tissing et al. [12]), but that plays a pivotal role in cell metabolism. Arginine is synthesized from glutamate via ornithine and the urea cycle. *Carbamoyl phosphate synthase*, *aspartate transcarbamylase*, *dihydroorotase* (CAD) and *ornithine decarboxylase* (ODC), which catalyze the first step in arginine synthesis via ornithine, are targets of *c-Myc* regulation [13-15]. Moreover, *argininosuccinate synthase* (AS), an enzyme that plays a key role in *de novo* synthesis of arginine and is highly expressed by ALL cells [16], is also under positive control by *c-Myc* [17]. Importantly, there is circumstantial evidence that girls average 27% greater glucocorticoid receptor (GR) binding capacity on mononuclear leukocytes than boys [18]. Accordingly, prednisolone was found to be 1.4

times more potent against women isolated lymphocytes than men [2]. Although we have no proof of a gender difference in GR on childhood ALL cells, our data seems consistent with higher sensitivity of female ALLs to prednisolone inhibition of *c-Myc*, which in turn leads to lower arginine synthesis, resulting in higher ornithine levels but increased consumption of arginine from the culture medium (Table 2). We could not find any relation among prednisolone, gender and acetone or pyridoxine.

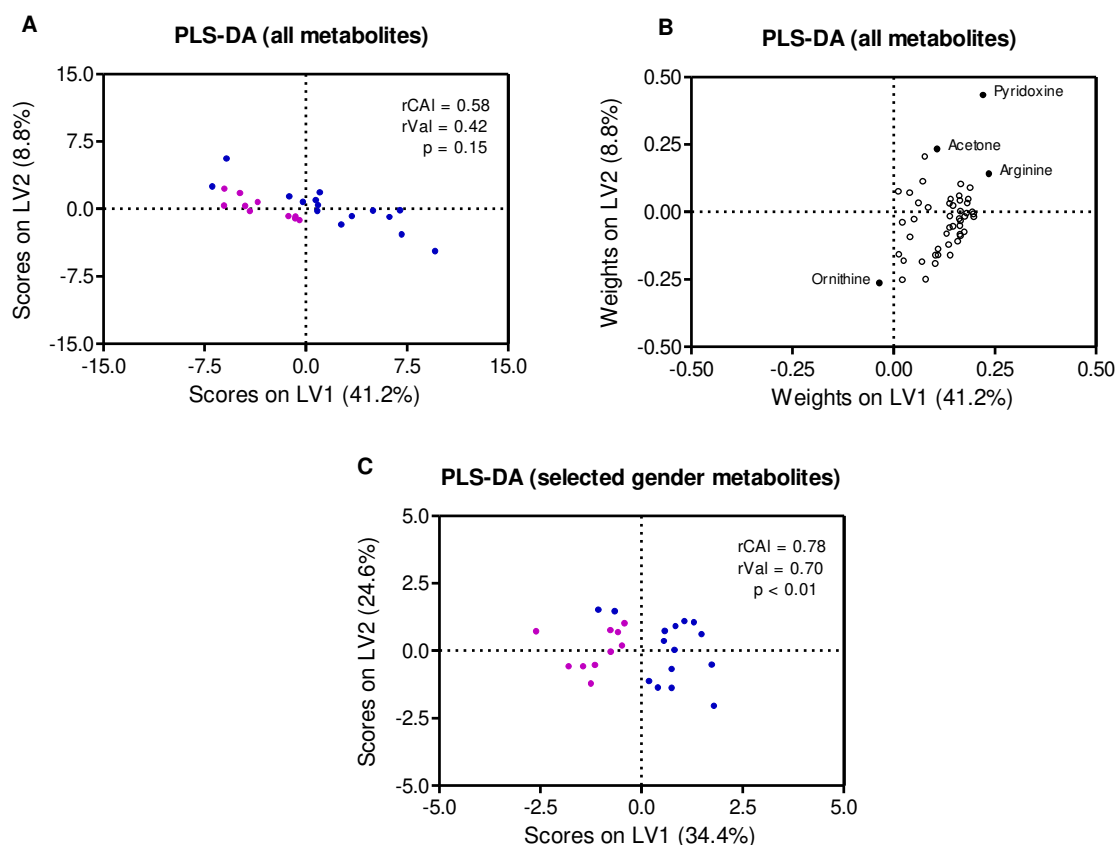


Figure 3. Supervised PLS-DA classification based on gender performed on metabolites in the conditioned culture medium of PRED-treated cells. (A) When all metabolites are included in the analysis, a subtle separation can be seen between males (blue) and females (pink). After selection of metabolites with higher weight values (labeled in B) a clearer separation between both groups is obtained (C).

Table 2. Concentrations (μM) of PRED-responsive gender-discriminant metabolites in 24 hrs conditioned culture media of primary ALL cells from female (n=10) versus male (n=15) children.

Metabolite	Control			PRED		
	Female	Male	P-value	Female	Male	P-value
Arginine	530.1 $\pm$ 97.8	543.8 $\pm$ 54.2	0.45	493.1 $\pm$ 22.4	534.8 $\pm$ 51.8	<0.05
Acetone	3.2 $\pm$ 2.1	2.7 $\pm$ 1.4	0.60	3.8 $\pm$ 1.8	5.3 $\pm$ 3.1	0.18
Ornithine	99.0 $\pm$ 21.1	87.0 $\pm$ 22.3	0.29	92.5 $\pm$ 17.8	86.4 $\pm$ 25.6	0.42
Pyridoxine	4.8 $\pm$ 1.9	5.3 $\pm$ 0.8	0.89	3.2 $\pm$ 1.4	4.6 $\pm$ 0.8	<0.05

Data correspond to average and standard deviation. P-values were calculated by the Mann-Whitney U test.

PRED response, i.e. blast cell reduction in peripheral blood to a 7-day PRED prephase has been largely used for patient stratification in childhood ALL, and to the best of our knowledge, a gender difference to prednisone response was never reported. Likewise, no association was found between gender and *in vitro* PRED resistance in this study. However, these were results obtained under excess amounts of arginine. Glucocorticoid induction of apoptosis in ALL cells is suggested to be a late event [12], reached after continuous metabolic repression [19]. Further studies are needed to show a possible use of this metabolic difference in patients' therapy.

References

1. Cheok MH, Yang W, Pui CH, Downing JR, Cheng C, et al. (2003) Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells. *Nat Genet* 34: 85-90.
2. Ferron GM, Pyszczyński NA, Jusko WJ (1998) Gender-related assessment of cyclosporine/prednisolone/sirolimus interactions in three human lymphocyte proliferation assays. *Transplantation* 65: 1203-1209.
3. Miller DR, Leikin SL, Albo VC, Palmer NF, Sather HN, et al. (1990) The prognostic value of testicular biopsy in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childrens Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 8: 57-66.
4. Harris RZ, Benet LZ, Schwartz JB (1995) Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drugs* 50: 222-239.
5. Magee MH, Blum RA, Lates CD, Jusko WJ (2001) Prednisolone pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to sex and race. *J Clin Pharmacol* 41: 1180-1194.
6. Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, Matsuda EI, Otubo R, et al. (2010) Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group--protocol ALL-99. *J Clin Oncol* 28: 1911-1918.
7. Scrideli CA, Assumpcao JG, Ganazza MA, Araujo M, Toledo SR, et al. (2009) A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica* 94: 781-789.

8. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, et al. (2004) Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 351: 533-542.
9. Thulasi R, Harbour DV, Thompson EB (1993) Suppression of c-myc is a critical step in glucocorticoid-induced human leukemic cell lysis. *J Biol Chem* 268: 18306-18312.
10. Obexer P, Certa U, Kofler R, Helmberg A (2001) Expression profiling of glucocorticoid-treated T-ALL cell lines: rapid repression of multiple genes involved in RNA-, protein- and nucleotide synthesis. *Oncogene* 20: 4324-4336.
11. Ploner C, Schmidt S, Presul E, Renner K, Schrocksnadel K, et al. (2005) Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93: 153-160.
12. Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Pieters R (2003) Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 17: 17-25.
13. Bello-Fernandez C, Packham G, Cleveland JL (1993) The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7804-7808.
14. Miltenberger RJ, Sukow KA, Farnham PJ (1995) An E-box-mediated increase in cad transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants. *Mol Cell Biol* 15: 2527-2535.
15. Miller AL, Johnson BH, Medh RD, Townsend CM, Thompson EB (2002) Glucocorticoids and polyamine inhibitors synergize to kill human leukemic CEM cells. *Neoplasia* 4: 68-81.
16. Ohno T, Kimura Y, Sakurada K, Sugimura K, Fujiyoshi T, et al. (1992) Argininosuccinate synthetase gene expression in leukemias: potential diagnostic marker for blastic crisis of chronic myelocytic leukemia. *Leuk Res* 16: 475-483.
17. Tsai WB, Aiba I, Lee SY, Feun L, Savaraj N, et al. (2009) Resistance to arginine deiminase treatment in melanoma cells is associated with induced argininosuccinate synthetase expression involving c-Myc/HIF-1 α /Sp4. *Mol Cancer Ther* 8: 3223-3233.
18. Aljubei J, Miller A, Meyer W, 3rd, Thompson B (2001) Glucocorticoid receptor characteristics in healthy childrens' leukocytes: correlation with gender, weight, age and plasma cortisol. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14: 1641-1647.
19. Kofler R (2000) The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem Cell Biol* 114: 1-7.

Supporting Information

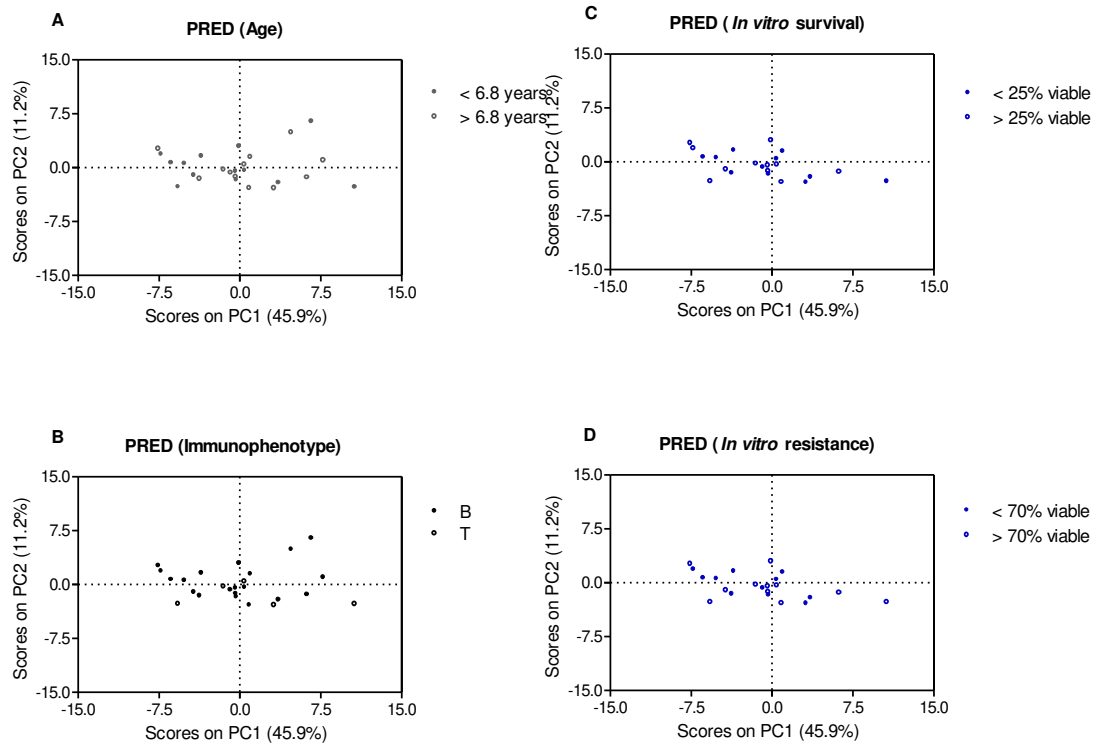


Figure S1. Unsupervised PCA analysis of PRED-treated samples considering different classes.

There was no clear separation with respect to all other characteristics. Continuous characteristics (age, *in vitro* cell survival and *in vitro* cell resistance to PRED) were categorized by using the median as the cut-off value. Three samples are missing in plots C and D as they lack survival analysis data.

5. Considerações Finais

Neste trabalho buscamos padronizar a metodologia de classificação de pacientes de leucemia em diferentes grupos de risco utilizando RMN e análise estatística multivariada. Muitos esforços têm sido feitos na tentativa de melhorar a classificação de risco de pacientes de LLA, com grandes avanços até aqui. A DRM é claramente um bom exemplo desses esforços e tem mostrado bons resultados na aplicação clínica. Porém ainda é importante reduzir o tempo necessário para se ter uma resposta. Hoje em dia, o experimento mais utilizado para determinar a citotoxicidade *in vitro* precisa de quatro dias para se obter uma resposta [55]. Pela DRM são necessários pelo menos 28 dias. Pela nossa metodologia seriam necessários apenas dois dias.

Outra grande vantagem é o fato desta metodologia ser baseada em um experimento *in vitro*, uma vez que a intensificação do tratamento aumenta o risco de toxicidade para o paciente e pode induzir doenças secundárias [56]. Desta forma o perfil metabólico do paciente pode ser determinado antes que ele faça uso de qualquer medicamento. Além disso, com o experimento *in vitro* é possível detectar a apoptose da célula através das primeiras alterações metabólicas. A tentativa de fazer isso *in vivo* não obteve sucesso uma vez que as células apoptóticas são rapidamente removidas da circulação por fagocitose [57].

A fase de validação nos mostrou que é necessário se fazer um estudo prospectivo uma vez que não haviam amostras congeladas suficientes que possuíssem viabilidade celular necessária para este tipo de análise. O limitado número de amostras de células de pacientes arquivadas impediu que fosse criado um modelo robusto de classificação, mas deu grandes indícios de que é possível se classificar pacientes com LLA baseando-se na resistência *in vitro* após 24 horas do tratamento com ASNase e PRED.

Apesar de experimentos complementares serem necessários, os resultados desse trabalho também nos permitiram tecer hipóteses sobre o mecanismo de resistência das células de LLA à ASNase e PRED. Recentemente, através do uso de microarranjos de oligonucleotídeos, Holleman e colaboradores [49] determinaram uma série de genes cuja expressão está associada à resistência ou sensibilidade aos diferentes quimioterápicos

normalmente usados na fase de indução. O padrão de expressão gênica (resistência versus sensibilidade às drogas) apresentou-se significativa e independentemente associado com a evolução clínica dos pacientes. Surpreendentemente, dos 124 genes identificados nesse estudo, 121 nunca haviam sido associados à resistência a drogas, o que mostra a falta de conhecimento em relação aos mecanismos de resistência à quimioterapia. A compreensão destes mecanismos parece ser fundamental para o aperfeiçoamento do tratamento da LLA da recaída assim como de pacientes novos. Não há alternativa senão a descoberta de novas drogas e alvos terapêuticos, pois a intensificação do atual regime de tratamento dificilmente conseguirá reverter o baixo índice de sobrevida da LLA de recaída, visto que tampouco tem sido capaz de levantar o índice de 80% de cura da LLA de novo, patamar atingido há aproximadamente três décadas atrás.

Anexo A

Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa



Centro Infantil
Boldrini

Campinas, 23 de julho de 2007.

Ilma. Sra.
CAROLINA PEREIRA DE SOUZA MELO
R: Julio Diniz, 291/302 Santa Branca
Belo Horizonte - MG
Cep: 31.565-180

Prezada Senhora,

Informamos que seu projeto intitulado **"PADRONIZAÇÃO DA RMN PARA DETERMINAÇÃO PRECOCE DA RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA NA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA"**, foi aprovado com recomendação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini) em 13/07/2007 (vide parecer em anexo).

Por se tratar de estudo retrospectivo, onde todo o levantamento de dados será feito com base nas informações contidas nos prontuários médicos, o CEP/Boldrini dispensa a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, mediante assinatura de "Termo de Sigilo" (anexo) junto ao Centro Infantil Boldrini.

Informamos que a cada 6 meses, deverá ser apresentado um relatório parcial sobre o andamento da pesquisa em questão (formulário: acompanhamento das pesquisas; disponível no site: www.boldrini.org.br ou no L : público/ CEC/ CEP Formulários) ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini)

Solicitamos que, após a conclusão do estudo, o mesmo seja encaminhado à Secretaria do CEP /Boldrini e apresentado aos profissionais do Centro Infantil Boldrini.

Colocamo-nos à disposição para maiores esclarecimentos.

Cordialmente,


Prof. Dr. Flávio César de Sá
Vice - Coordenador do CEP/Boldrini

P.S.: Pedimos a gentileza de acusar o recebimento

Anexo B

Depósito de Pedido de Patente

 INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO 0204 17/11/2011 020110117255 14:46 NPRJ  0000221112119757	< Uso exclusivo do INPI >
Espaço reservado ao protocolo	Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE LUZ SINCROTON-ABTLUS
1.2 Qualificação
1.3 CNPJ/CPF: 01576817/0001-75
1.4 Endereço Completo RUA GIUSEPPE MÁXIMO SCOLFARO Nº10.000 CAMPINAS SP
1.5 CEP: 1.6 Telefone 1.7 Fax:
1.8 E-mail:

☒ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **PATENTE DE INVENÇÃO**

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO CÂNCER A QUIMIOTERÁPICOS, MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE PERFIS METABÓLITOS, CONJUNTO DE METABÓLITOS, SEU USO E KIT.

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº Data de Depósito:

5. Prioridade: ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: CAROLINA PEREIRA DE SOUZA MELO
6.2 Qualificação ENGENHEIRA QUÍMICA 6.3 CPF:
6.4 Endereço completo RUA ALAMEDA DOS PINHEIROS, 540 ITABIRITO - MG
6.5 CEP: 35450-000 6.6 Telefone: 6.7 Fax:
6.8 E-Mail:

☒ continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome: TAVARES PROPRIEDADE INTELECTUAL LTDA

9.2 CNPJ/CPF: 42.416.453/0001-43

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo RUA MARECHAL FLORIANO Nº45-6ºANDAR RIO DE JANEIRO - RJ

9.5 CEP: 20080-003

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).
☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
☐ Listagem de sequências em formato impresso: fls.
☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

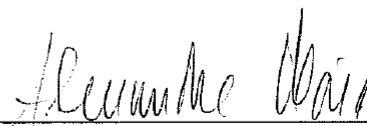
11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	20 fls.
☒	11.2 Procuração	2 fls.	☒	11.6 Reivindicações	4 fls.
☐	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	☒	11.7 Desenhos	8 fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	1 fls.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) ANEXO DO INVENTORES E ANEXO DOS DEPOSITANTES				2 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 38 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Rio de Janeiro, 14 de Novembro de 2011
Local e Data


Assinatura e Carimbo

TAVARES Propriedade Intelectual Ltda. - API 817 RJ
Alexandre P. L. Maia

ANEXO DOS DEPOSITANTES

Título: “MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO CÂNCER A QUIMIOTERÁPICOS, MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE PERFIS METABÓLITOS, CONJUNTO DE METABÓLITOS, SEU USO E KIT”

DEPOSITANTE:

NOME: CENTRO INFANTIL DE INVESTIGAÇÃO HEMATOLÓGICAS DR. DOMINGOS A. BOLDRINI

CNPJ:50.046.887/0001-27

ENDEREÇO COMPLETO: RUA DR. GABRIEL PORTO, Nº1270, CIDADE UNIVERSITÁRIA, DISTRITO DE BARÃO GERALDO – CAMPINAS – SP

Rio de Janeiro, 17 de novembro de 2011.



FAVARES Propriedade Intelectual Ltda. - API 817 RJ
Alexandre P. L. Maia

ANEXO DOS INVENTORES

Título: “MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO CÂNCER A QUIMIOTERÁPICOS, MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE PERFIS METABÓLITOS, CONJUNTO DE METABÓLITOS, SEU USO E KIT”

Nome: Ana Carolina de Mattos Zeri

Endereço: Rua Professor Celso Ferrz de Camargo, 321 - Campinas - SP - CEP.: 13083-200

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação: Física, Bioquímica

Nome: Jose Andres Yunes

Endereço: Rua Abilio Vilela Junqueira, 74 - Campinas, SP - CEP.: 13085-420

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação: Engenheiro Agrônomo

Nome: Rafael Renatino Canevarolo

Endereço: Av. Dr. Romeu Tortima, 770, apto 11 - Cidade Universitária, Campinas, SP –
CEP: 13083-897

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação: Biólogo

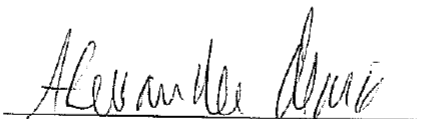
Nome: Silvia Regina Brandalise

Endereço: Av. Professor Atilio Martini, 701, Campinas, SP - CEP.: 13083-830

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação: Médica

Rio de Janeiro, 17 de novembro de 2011.



FAVARES Propriedade Intelectual Ltda. - API 817 RJ
Alexandre P. L. Maia

Referências

1. Pui, C.H., *Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Formos Med Assoc, 2010. **109**(11): p. 777-87.
2. Graux, C., *Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance*. Transfus Apher Sci, 2011. **44**(2): p. 183-9.
3. Schultz, K.R., et al., *Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG)*. Blood, 2007. **109**(3): p. 926-35.
4. Pieters, R. and W.L. Carroll, *Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am, 2010. **24**(1): p. 1-18.
5. Pui, C.H. and W.E. Evans, *Treatment of acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 2006. **354**(2): p. 166-78.
6. Szczepanski, T., et al., *Minimal residual disease in leukaemia patients*. Lancet Oncol, 2001. **2**(7): p. 409-17.
7. Szczepanski, T., *Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia?* Leukemia, 2007. **21**(4): p. 622-6.
8. Nyvold, C., et al., *Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1253-8.
9. Dworzak, M.N., et al., *Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2002. **99**(6): p. 1952-8.
10. Bruggemann, M., et al., *Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2006. **107**(3): p. 1116-23.
11. Swerts, K., et al., *Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Eur J Cancer, 2006. **42**(3): p. 295-309.
12. Bhojwani, D., et al., *Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study*. Blood, 2006. **108**(2): p. 711-7.
13. Pui, C.H., et al., *Failure of late intensification therapy to improve a poor result in childhood lymphoblastic leukemia*. Cancer Res, 1984. **44**(8): p. 3593-8.
14. Pieters, R., et al., *Clinical relevance of in vitro drug resistance testing in childhood acute lymphoblastic leukemia: the state of the art*. Med Pediatr Oncol, 1994. **22**(5): p. 299-308.
15. Kaspers, G.J., et al., *In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1997. **90**(7): p. 2723-9.
16. Bren, L., *Metabolomics: working toward personalized medicine*. FDA Consum, 2005. **39**(6): p. 28-33.
17. Nicholson, J.K. and J.C. Lindon, *Systems biology: Metabonomics*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1054-6.
18. Roessner, U. and J. Bowne, *What is metabolomics all about?* Biotechniques, 2009. **46**(5): p. 363-5.

19. Gieger, C., et al., *Genetics meets metabolomics: a genome-wide association study of metabolite profiles in human serum*. PLoS Genet, 2008. **4**(11): p. e1000282.
20. Fernie, A.R., et al., *Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(9): p. 763-9.
21. Van, Q.N. and T.D. Veenstra, *How close is the bench to the bedside? Metabolic profiling in cancer research*. Genome Med, 2009. **1**(1): p. 5.
22. Dunn, W.B., et al., *Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Chem Soc Rev, 2011. **40**(1): p. 387-426.
23. Lindon, J.C., E. Holmes, and J.K. Nicholson, *Metabonomics in pharmaceutical R&D*. FEBS J, 2007. **274**(5): p. 1140-51.
24. Kaddurah-Daouk, R., B.S. Kristal, and R.M. Weinshilboum, *Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008. **48**: p. 653-83.
25. Nordstrom, A. and R. Lewensohn, *Metabolomics: moving to the clinic*. J Neuroimmune Pharmacol, 2010. **5**(1): p. 4-17.
26. Coen, M., et al., *Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics for rapid diagnosis of meningitis and ventriculitis*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(11): p. 1582-90.
27. Young, S.P., et al., *Metabolomic analysis of human vitreous humor differentiates ocular inflammatory disease*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 1210-7.
28. Clayton, T.A., et al., *Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(34): p. 14728-33.
29. Sitter, B., et al., *Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy*. NMR Biomed, 2010. **23**(4): p. 424-31.
30. Gottschalk, S., et al., *Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(19): p. 6661-8.
31. Tiziani, S., V. Lopes, and U.L. Gunther, *Early stage diagnosis of oral cancer using 1H NMR-based metabolomics*. Neoplasia, 2009. **11**(3): p. 269-76, 4p following 269.
32. Wilson, P.K., S.P. Mulligan, and R.I. Christopherson, *Metabolic response patterns of nucleotides in B-cell chronic lymphocytic leukaemias to cladribine, fludarabine and deoxycoformycin*. Leuk Res, 2004. **28**(7): p. 725-31.
33. MacIntyre, D.A., et al., *Serum metabolome analysis by 1H-NMR reveals differences between chronic lymphocytic leukaemia molecular subgroups*. Leukemia, 2010. **24**(4): p. 788-97.
34. Cano, K.E., et al., *NMR-based metabolomic analysis of the molecular pathogenesis of therapy-related myelodysplasia/acute myeloid leukemia*. J Proteome Res, 2011. **10**(6): p. 2873-81.
35. Malet-Martino, M. and U. Holzgrabe, *NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis*. J Pharm Biomed Anal, 2011. **55**(1): p. 1-15.
36. Spratlin, J.L., N.J. Serkova, and S.G. Eckhardt, *Clinical applications of metabolomics in oncology: a review*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(2): p. 431-40.
37. Vinayavekhin, N., E.A. Homan, and A. Saghatelian, *Exploring disease through metabolomics*. ACS Chem Biol, 2010. **5**(1): p. 91-103.

38. Ludwig, C., et al., *Fast targeted multidimensional NMR metabolomics of colorectal cancer*. Magn Reson Chem, 2009. **47 Suppl 1**: p. S68-73.
39. Keating, M.J., et al., *L-asparaginase and PEG asparaginase--past, present, and future*. Leuk Lymphoma, 1993. **10 Suppl**: p. 153-7.
40. Koizumi, S. and T. Fujimoto, *Improvement in treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: a 10-year study by the Children's Cancer and Leukemia Study Group*. Int J Hematol, 1994. **59**(2): p. 99-112.
41. Irino, T., et al., *Establishment of real-time polymerase chain reaction method for quantitative analysis of asparagine synthetase expression*. J Mol Diagn, 2004. **6**(3): p. 217-24.
42. Kiriya, Y., et al., *Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase*. Leukemia, 1989. **3**(4): p. 294-7.
43. Dubbers, A., et al., *Asparagine synthetase activity in paediatric acute leukaemias: AML-M5 subtype shows lowest activity*. Br J Haematol, 2000. **109**(2): p. 427-9.
44. Rotoli, B.M., et al., *Inhibition of glutamine synthetase triggers apoptosis in asparaginase-resistant cells*. Cell Physiol Biochem, 2005. **15**(6): p. 281-92.
45. Fine, B.M., et al., *A genome-wide view of the in vitro response to l-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Res, 2005. **65**(1): p. 291-9.
46. Tada, H., et al., *An improved colorimetric assay for interleukin 2*. J Immunol Methods, 1986. **93**(2): p. 157-65.
47. Nunn, A.V., et al., *Characterisation of secondary metabolites associated with neutrophil apoptosis*. FEBS Lett, 1996. **392**(3): p. 295-8.
48. Le Belle, J.E., et al., *A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution 1H-NMR spectroscopy*. NMR Biomed, 2002. **15**(1): p. 37-44.
49. Holleman, A., et al., *Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment*. N Engl J Med, 2004. **351**(6): p. 533-42.
50. Grigoryan, R.S., et al., *Changes of amino acid serum levels in pediatric patients with higher-risk acute lymphoblastic leukemia (CCG-1961)*. In Vivo, 2004. **18**(2): p. 107-12.
51. Malinowski, E.R., *Factor Analysis in Chemistry*. 3rd ed, ed. J.W.S. Ltd2002, New York.
52. Martins, A.M.C.R.P.d.F., *Metabolismo da glutamina na célula tumoral*. Arq. Inst. Biol., 2003. **70**(2): p. 231-237.
53. Hulleman, E., et al., *Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells*. Blood, 2009. **113**(9): p. 2014-21.
54. Pelicano, H., et al., *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4633-46.
55. Pieters, R., et al., *In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions*. Blood, 1990. **76**(11): p. 2327-36.
56. Flohr, T., et al., *Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2008. **22**(4): p. 771-82.
57. Appel, I.M., et al., *Pharmacokinetic, pharmacodynamic and intracellular effects of PEG-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: results from a single agent window study*. Leukemia, 2008. **22**(9): p. 1665-79.