

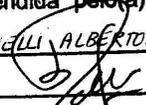


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANGELO BRUNELLI ALBERTONI LARANJEIRA

**“PARTICIPAÇÃO DO *IGFBP7* NA INTERAÇÃO
LEUCEMIA-ESTROMA E NA RESISTÊNCIA A
QUIMIOTERAPIA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ANGELO BRUNELLI ALBERTONI LARANJEIRA

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Biologia Molecular, na área de
Genética Animal e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes

Campinas, 2012

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

| | |
|------|---|
| L32p | <p>Laranjeira, Angelo Brunelli Albertoni, 1981 Participação do IGFBP7 na interação leucemia- estroma e na resistência a quimioterapia / Angelo Brunelli Albertoni Laranjeira. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: José Andrés Yunes. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Leucemia linfóide aguda. 2. Estroma da medula óssea. 3. Resistência a quimioterápicos. 4. Insulina. 5. Gene IGFBP7 humano. I. Yunes, José Andrés. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> |
|------|---|

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: IGFBP7 participates in the reciprocal interaction between leukemia and BM stroma and in leukemia resistance to chemotherapy

Palavras-chave em Inglês:

Acute lymphoblastic leukemia

Bone marrow stroma

Chemotherapeutics resistance

Insulin

Human IGFBP7 gene

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Andrés Yunes [Orientador]

José Barreto Campello Carvalheira

Sandra Martha Gomes Dias

Andre Charles Baruchel

Luiz Fernando Celidonio Zerbini

Data da defesa: 08-05-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 8 de maio de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Andrés Yunes (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

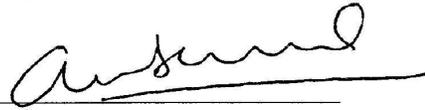


Assinatura

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Assinatura

Prof. Dr. Andre Charles Baruchel



Assinatura

Prof. Dr. Luiz Fernando Celidonio Zerbini

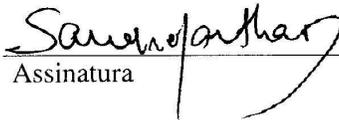


Assinatura

Profa. Dra. Dirce Maria Carraro

Assinatura

Profa. Dra. Sandra Martha Gomes Dias



Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Assinatura

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| AGRADECIMENTOS..... | vi |
| RESUMO..... | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| LISTA DE TABELAS..... | xi |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. CÂNCER..... | 1 |
| 1.2. LEUCEMIA..... | 2 |
| 1.3. MICROMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA..... | 5 |
| 1.4. INTERAÇÃO LEUCEMIA E MICROAMBIENTE..... | 7 |
| 1.4.1. CONTRIBUIÇÃO PARA A ONCOGÊNESE..... | 7 |
| 1.4.2. CONTRIBUIÇÃO PARA A RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA..... | 9 |
| 1.5. O SISTEMA IGF..... | 12 |
| 1.5.1. IGFS/INSULINA E SEUS RECEPTORES..... | 16 |
| 1.5.2. IGFBP7 E INSULINA/IGFS..... | 18 |
| 2. OBJETIVOS..... | 21 |
| 3. MANUSCRITO..... | 22 |
| 4. MÉTODOS COMPLEMENTARES..... | 50 |
| 4.1. MIGRAÇÃO E ADESÃO..... | 50 |
| 4.2. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR - ENSAIO DE MTT..... | 50 |
| 5. RESULTADOS COMPLEMENTARES E DISCUSSÃO..... | 52 |
| 5.1. IGFBP7 E INSULINA/IGF1 NA RESISTÊNCIA À ASPARAGINASE..... | 52 |
| 5.2. PAPEL DA IGFBP7 NA PROGRESSÃO DA LLA EM MODELOS ANIMAIS (NOD/SCID)..... | 58 |
| 5.3. IGFBP7 NA RESISTÊNCIA A DIFERENTES QUIMIOTERÁPICOS..... | 59 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 66 |
| 7. ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DE DOUTORAMENTO..... | 67 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 68 |
| Anexo 1..... | 77 |
| Anexo 2..... | 78 |
| Anexo 3..... | 80 |
| Anexo 4..... | 83 |

Dedico este trabalho a todos os portadores de leucemia, esperando que toda informação contida neste trabalho venha de alguma forma ser útil, e possa trazer a esperança de uma vida melhor.

AGRADECIMENTOS

Acredito que não devo agradecer aqui apenas aos que me ajudaram diretamente no desenvolvimento do meu doutorado. Estipular uma ordem de prioridade ou de significância para cada um é impossível.

Agradeço ao meu amigo e orientador Dr. José Andrés Yunes não só por ter confiado, mas também por ter acreditado em mim e no meu potencial. Por me ter mostrado que o mais importante na ciência e na vida não é fazer muito, mas fazer bem feito o pouco que se faz. Seu exemplo de humildade e criatividade ficarão para sempre.

Pela oportunidade de integrar o seu grupo, além do apoio, ensinamentos e paciência durante todo o desenvolvimento do nosso trabalho. Agradecimento especial pela liberdade proporcionada para execução de ideias e dedicação em me ensinar a escrever artigos científicos. Esses ensinamentos serão importantíssimos para minha vida profissional.

O que seria de mim sem a minha esposa Érica, me dando apoio incondicional em todos os momentos? Estamos construindo nossa vida juntos e estou certo de que ela é imprescindível em todas as vitórias que estamos conquistando.

A minha querida filha Ana Clara e sua irmã Giulia, por todos os momentos de carinho e alegria.

Aos meus pais Paulo e Ana Lúcia; ao meu irmão Júlio; aos meus avós Olívio, Tereza e Maria; por terem torcido e rezado de longe, e também por terem compreendido calmamente meus longos períodos de ausência.

Aos pais da minha esposa Lúcia e Marcos por toda ajuda e amizade.

Agradeço aos Drs. Jörg Kobarg e Fábio Papes, que acompanharam todo o desenvolvimento do meu trabalho, sendo muito importantes pela presteza nas correções da pré-banca e conselhos de grande valor dados.

Ao pessoal do CIPOI (Dr. Alexandre Nowill, Gilberto, Carol, Márcia, Sílvia, Vanair, Flávio, Nei, Almir, KioBio) e ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular (Centro Infantil Boldrini), aos quais não tenho como exaltar a minha gratidão, por terem me ajudado em todos os momentos da execução da minha tese.

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, pela análise do perfil de aminoácidos por HPLC de fase reversa; e ao André Bortolini pelas análises de microarranjos.

À Dra. Sílvia Brandalise que confiou e incentivou o meu trabalho.

E como não poderia deixar de ser, agradeço ao suporte financeiro da FAPESP sem os quais seria impossível o desenvolvimento desse trabalho.

Finalmente eu agradeço a Deus por ter me permitido terminar este trabalho dignamente.

RESUMO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é o tipo de câncer mais comum que acomete crianças. Sabe-se que a interação do tumor com o contexto celular do hospedeiro (microambiente tumoral) é recíproca, ou seja, na medida em que o tumor estimula o seu microambiente, este potencializa a sobrevivência, proliferação e invasividade tumoral. A interação da LLA com as células estromais da medula óssea tem um impacto positivo na resistência das células leucêmicas à quimioterapia. No presente estudo foi investigado a modulação de uma série genes de sensibilidade e resistência à asparaginase em células de LLA-B precursoras após co-cultura com as células estromais. Mostramos o aumento da expressão e secreção da IGFBP7 pelas células leucêmicas após co-cultivo com células do estroma da medula óssea. Em ensaios com o silenciamento do *IGFBP7* em células leucêmicas e células estromais, mostramos que a IGFBP7 atua regulando positivamente o crescimento celular e aumenta a resistência a asparaginase. A IGFBP7 ‘leucêmica’ junto com IGF/insulina atua sobre as células estromais, induzindo nestas células o aumento da produção de asparagina, e diminuindo a ação da asparaginase. Além deste mecanismo de resistência dependente das células estromais, mostramos que a IGFBP7 em conjunto com IGF/insulina promove a resistência das células leucêmicas à ação de outros compostos quimioterápicos (dexametasona e metotrexato) de forma independente da interação leucemia-estroma. Ainda pode ser observado que o plasma de crianças com LLA ao diagnóstico, apresenta maiores níveis de IGFBP7 do que em amostras controles. É importante ressaltar que níveis mais altos de mRNA *IGFBP7* foram associados com menor sobrevida livre de leucemia (Modelo de regressão de Cox, $P = 0,003$), em células de LLA-B Ph(-) precursoras.

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common type of cancer that affects children. It is known that the interaction between tumor and the cellular context of the host (tumor microenvironment) is reciprocal, ie, to the extent that the tumor stimulates their microenvironment, this enhances the survival, proliferation and tumor invasiveness. The interaction of ALL with bone marrow stromal cells has a positive impact on leukemia resistance to chemotherapy. In the present study, we investigated the modulation of a series of putative asparaginase-resistance/sensitivity genes in B-precursor ALL upon co-culture with stromal cells. We showed an increase expression and secretion of IGFBP7 in leukemic cells after co-culture with BMSCs. Assays with *IGFBP7* knockdown in leukemic cells and stromal cells, showed that IGFBP7 acts as a positive regulator of cell growth and increases resistance to asparaginase. 'Leukemic' IGFBP7 together with IGF/insulin acts on stromal cells, increasing asparagine production, thus reducing the asparaginase effect. Besides this mechanism of resistance dependent of stromal cells, we showed that IGFBP7 in conjunction with IGF/insulin promotes the resistance of leukemia cells to the action of other chemotherapeutic compounds (dexamethasone and methotrexate) independently of the interaction leukemia-stroma. We still observed that diagnostic BM plasma from children with ALL at diagnosis, have higher levels of IGFBP7 than control samples. Importantly, higher levels of IGFBP7 mRNA were associated with lower leukemia-free survival (Cox regression model, $P = 0.003$) in precursor B-ALL Ph (-) patients.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Anormalidades Genéticas na Leucemia Linfoide Aguda (LLA) | 04 |
| Figura 2. Representação esquemática dos nichos da medula óssea | 06 |
| Figura 3. Esquema simplificado das vias de sinalização da insulina, IGF1 e IGF2 | 14 |
| Figura 4. Expressão dos diferentes exons do <i>INSR</i> em amostras de LLA pediátrica | 15 |
| Figura 5. Efeito da IGFBP7 na proliferação das células de LLA-T | 53 |
| Figura 6. Influência da IGFBP7 e/ou insulina na adesão e migração das linhagens de LLA-B derivada | 54 |
| Figura 7. Mecanismos de ação da IGFBP7 na resistência a quimioterapia da LLA | 56 |
| Figura 8. Associação da expressão de <i>IGFBP7</i> com o grau de maturação das células primárias de LLA-B | 57 |
| Figura 9. Impacto do silenciamento do <i>IGFBP7</i> na progressão da linhagem de LLA RS4;11 em camundongos NOD/SCID | 58 |
| Figura 10. Heatmap das células primárias de pacientes com LLA | 61 |
| Figura 11. Mecanismos de ação da IGFBP7 na resistência a quimioterapia da LLA | 62 |
| Figura 12. Resistência das linhagens de LLA à ação de diferentes compostos quimioterápicos | 64 |
| Figura 13. Resistência das células primárias de LLA B-derivada à ação da dexametasona, mediado pela adição de IGFBP7:insulina/IGF1 | 65 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos tipos de câncer na infância

03

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

O desenvolvimento e o crescimento normal envolvem processos altamente regulados que incluem: a proliferação celular, a diferenciação celular e a morte celular programada (apoptose). Um complexo sistema assegura o controle adequado sobre esses processos fisiológicos. Para realizar este controle, em condições normais, os diferentes tipos celulares que constituem os tecidos e órgãos utilizam vias de sinalização para responder ao seu microambiente, a estímulos externos e as suas células vizinhas (Bissell e Radisky, 2001; Davidoff, 2010).

Ocasionalmente a sinalização que define o contexto normal é quebrada. Com a progressão deste processo a organização normal do órgão é substituída por uma desordem funcional, que pode levar a aquisição de um potencial tumorigênico. Sendo assim, a alteração ou inativação de qualquer um dos componentes das vias de regulação, nas células normais, pode levar a uma desregulação do crescimento e o desenvolvimento do câncer (Bissell e Radisky, 2001; Davidoff, 2010). Dentre as alterações que as células tumorais carregam em seu DNA e que podem alterar o funcionamento destas vias de regulação estão: mutações pontuais, inserções virais, alteração no conteúdo de DNA, deleções, ativação de proto-oncogenes, translocações cromossômicas, inativação de genes supressores tumorais, alterações epigenéticas (metilação do DNA ou modificação das histonas), expressão de micro-RNAs, alterações nas vias apoptóticas, entre outras (Hanahan e Weinberg, 2011).

Existem muitas evidências que indicam que a tumorigênese em humanos é um processo de múltiplos passos, que refletem alterações genéticas levando a uma progressiva alteração das células normais em células malignas. Estas alterações, que ocorrem na

maioria dos tipos de câncer, fazem com que eles adquiram uma série de vantagens funcionais durante o desenvolvimento e progressão. Nesta linha, muitos trabalhos mostraram que o genoma das células tumorais apresenta múltiplos sítios de alteração que poderiam estar contribuindo, passo a passo, com a aquisição dessas vantagens funcionais (Hanahan e Weinberg, 2000).

1.2. LEUCEMIA

As leucemias são neoplasias malignas que afetam as células precursoras hematopoiéticas e originalmente se localizam na medula óssea. Elas são originadas a partir de uma disfunção de células precursoras de origem linfóide ou mielóide, que leva a uma expansão clonal desordenada, promovendo o acúmulo de células blásticas na medula óssea e resultando na supressão da hematopoiese normal e infiltração de vários sítios extramedulares (Cobaleda e Garcia, 2009). Assim como outros tipos de tumores, a leucemia resulta de um processo com múltiplos passos associados com a aquisição de alterações genéticas nos blastos leucêmicos (Carrol e Raetz, 2012).

As leucemias podem ser classificadas de acordo com dois aspectos clínico-patológicos: linhagem sanguínea (células precursoras de origem linfóide ou mielóide) e grau de maturação da célula que a originou (aguda ou crônica). As leucemias agudas consistem em células progenitoras imaturas, sendo caracterizadas por um rápido crescimento e normalmente acometem crianças. As leucemias crônicas são caracterizadas por células com elevado grau de maturação, sendo produzidas de forma mais lenta e podendo levar meses e até anos para progredirem. Este subtipo de leucemia normalmente acomete as pessoas mais velhas. Sendo assim as leucemias podem ser classificadas como:

Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Mielóide Crônica (LMC) (Misaghian *et al.*, 2009).

A LLA é o tipo de câncer mais comum em crianças, sendo responsável por aproximadamente um quarto de todos os tipos de câncer que ocorrem antes dos 15 anos de idade (**Tabela 1**) (Smith *et al.*, 1999; Pui, 2010). Dependendo da linhagem celular acometida, a LLA é subdividida em LLA de células B precursoras (LLA B-derivada; 85% dos casos) ou LLA de células T (LLA-T; 15% dos casos) (Smith *et al.*, 2005; Sinnet *et al.*, 2006; Graux, 2011). Os avanços na área de biologia molecular têm ajudado a desvendar as alterações genéticas subjacentes à LLA, revelando ao mesmo tempo o caráter bastante heterogêneo da doença (**Figura 1**) (Pui *et al.*, 2011).

Tabela 1. Distribuição dos tipos de câncer na infância.

| Tipo de câncer | Porcentagem |
|-----------------------|--------------------|
| Leucemia | 25 |
| Tumor no cérebro | 20 |
| Linfoma | 15 |
| Neuroblastoma | 8 |
| Sarcoma | 7 |
| Tumor de Wilms | 6 |
| Osteosarcoma | 5 |
| Retinoblastoma | 3 |
| Tumor no fígado | 1 |

Apesar do grande avanço no tratamento da LLA, com uso combinado de quimioterápicos, aproximadamente 20 – 30% dos pacientes apresentam células leucêmicas resistentes ao tratamento e sofrem recaída da doença (Pui *et al.*, 2004; Pui *et al.*, 2011).

Entender os mecanismos de resistência à quimioterapia parece ser fundamental para o aperfeiçoamento do tratamento da LLA. Não há alternativa senão a descoberta de novas drogas e alvos terapêuticos, pois a intensificação do atual regime de tratamento não têm se mostrado capaz de levantar o índice de cura acima de 80%, patamar atingido há aproximadamente 3 décadas atrás (Smith, 2009).

Grandes progressos têm sido feitos no entendimento da fisiopatologia molecular da LLA. A caracterização de translocações cromossômicas permitiu a identificação de genes críticos para o processo. Além disso, a presença de translocações particulares, frequentemente tem importância prognóstica e podem ser usadas para a estratificação de pacientes que necessitam de terapias mais ou menos intensivas.

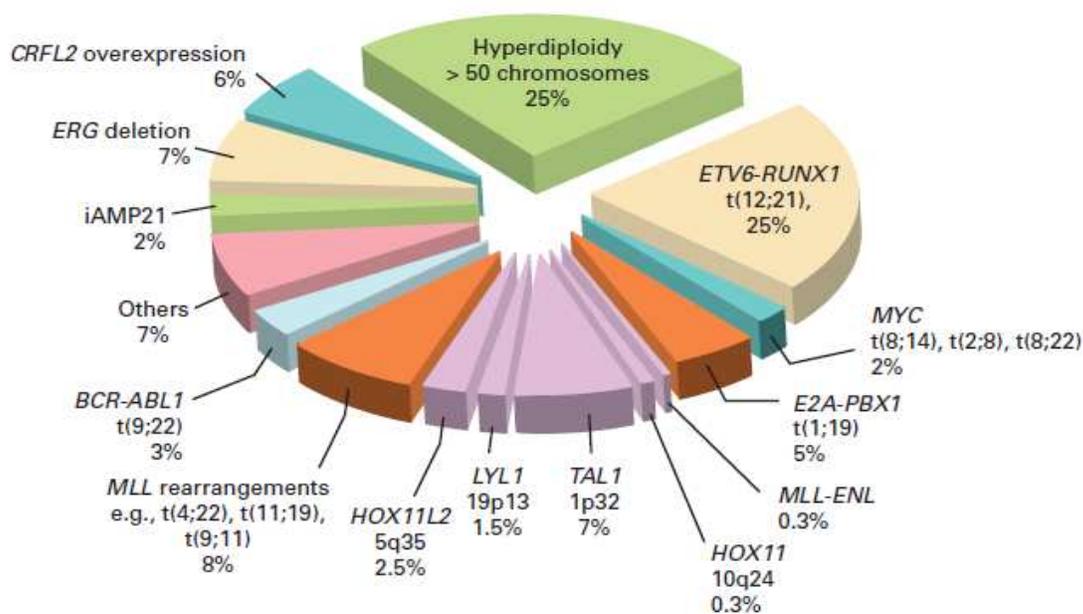


Figura 1. Anormalidades genéticas na Leucemia Linfóide Aguda (LLA). As anormalidades genéticas exclusivas dos casos de LLA-T estão indicadas em roxo (Pui *et al.*, 2011).

Os eventos oncogênicos, provocados por rearranjos cromossômicos, são provavelmente insuficientes para causar a leucemia. Ao invés disso, alterações genéticas que danificam o processo de diferenciação cooperam provavelmente com uma segunda classe de mutações que alteram a proliferação e a sobrevivência dos progenitores hematopoiéticos. Embora este esquema seja uma grande simplificação, ele fornece uma base para a investigação dos genes que colaboram na patogênese da LLA (PUI *et al.*, 2004).

Os mecanismos que contribuem com o surgimento da LLA estão relacionados à expressão de proto-oncogenes, inibição da expressão de genes supressores, translocações cromossômicas, que promovem a fusão de genes codificantes de kinases e alteram fatores de transcrição, e diferentes aneuploidias. Estas alterações genéticas contribuem para a transformação das células-tronco hematopoiéticas ou suas precursoras em leucêmicas. Elas alteram os processos regulatórios da capacidade de auto-renovação, alterando os controles normais de proliferação, bloqueando a diferenciação e promovendo a resistência aos sinais de morte (apoptose) (PUI *et al.*, 2004).

1.3. MICROMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA

A medula óssea pode ser encontrada nas cavidades medulares dos ossos ao longo do esqueleto, sendo que a hematopoiese ocorre dentro do complexo microambiente da medula óssea. É sabido que a medula óssea contém células aderentes que criam, no microambiente, nichos específicos para manutenção das células-tronco hematopoiéticas e fornecem os fatores necessários ao seu desenvolvimento. Os nichos hematopoiéticos são conceitualmente divididos em duas partes: zona osteoblástica, localizada na superfície interna da cavidade do osso e que fornece o microambiente para as células-tronco

hematopoiéticas (contribui para a hematopoiese – mantém a quiescência ou diminui o ciclo celular) (próxima aos osteoblastos); e zona vascular que é responsável por promover a proliferação e diferenciação das células ativamente em ciclo celular (próxima aos sinusóides) (Suda *et al.*, 2005; Bergfeld e DeClerk, 2010; Konopleva e Jordan, 2011) (Figura 2).

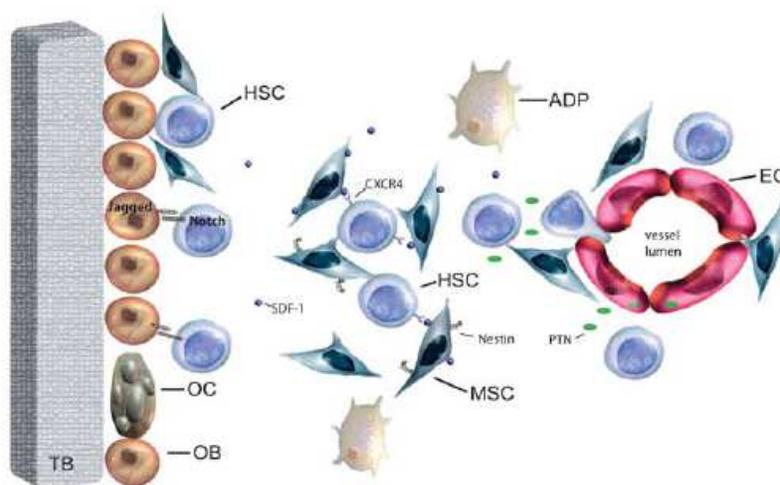


Figura 2. Representação esquemática dos nichos na medula óssea. Como mostrado, as células-tronco hematopoiéticas dinamicamente interagem com os diversos tipos celulares presentes no microambiente da medula óssea (TB – zona trabecular; HSC – células tronco hematopoiéticas; MSC – células tronco mesenquimais; OC – osteoclastos; OB – osteoblastos; ADP – adipócitos; EC – células endoteliais). Apesar dos nichos estarem representados separadamente, eles são fisicamente e funcionalmente interligados.

O estroma da medula óssea é formado por diversos tipos celulares que, além de terem uma função estrutural, desempenham um importante papel na proliferação, maturação e tráfico das células do sangue na medula. Dentre estes tipos celulares estão presentes: células endoteliais, fibroblastos, reticulócitos, monócitos, osteoclastos, adipócitos, além de células-tronco. As duas principais populações de células-tronco, que estão presentes na medula óssea, compreendem as células-tronco mesenquimais e as

hematopoiéticas. As células-tronco mesenquimais são capazes de se diferenciar em uma grande variedade de tipos de células mesenquimais; sendo que na medula óssea elas são capazes de promover a regulação do microambiente que controla a proliferação das células-tronco hematopoiéticas.

Como as diversas linhagens de precursores hematopoiéticos derivam de precursores multipotentes em comum e se desenvolvem em espaços com grande densidade celular na medula óssea, a organização espacial das células sanguíneas e a sua interação com o microambiente são de grande importância (Nagasawa, 2006).

No contexto do microambiente tumoral, as células-tronco mesenquimais contribuem regulando a apoptose, a angiogênese e ainda têm um papel na imunomodulação (efeito imunossupressor) (Raffi *et al.*, 1997; Sensebe *et al.*, 1997; Torok-Sorb *et al.*, 1999; Wolf *et al.*, 1999; Keihani *et al.*, 2001; Nagasawa, 2006; Bergfeld e DeClerk, 2010). Da mesma forma, o comportamento das células-tronco leucêmicas é influenciado pelos diferentes componentes do microambiente. Sendo assim, pode-se dizer que o estroma da medula óssea participa da patogenia da leucemia e também está relacionado com o tipo de resposta à quimioterapia (Wu *et al.*, 2005, Suda *et al.*, 2005; Bergfeld e DeClerk, 2010).

1.4. INTERAÇÃO LEUCEMIA E MICROAMBIENTE

1.4.1. CONTRIBUIÇÃO PARA A ONCOGÊNESE

Os eventos iniciais que levam à iniciação e evolução dos estados pré-malignos permanecem desconhecidos; entretanto, o envolvimento de um microambiente permissivo tem sido hipotetizado (Raaijmakers, 2011).

O microambiente é o lugar apropriado para as células-tronco do câncer. Os sinais do microambiente tumoral são responsáveis pela grande dificuldade na erradicação das células de câncer. Os tumores hematológicos se desenvolvem em microambientes especializados como a medula óssea e órgãos linfóides secundários. Estes microambientes são caracterizados por diferentes populações de células acessórias que interagem com as células malignas e promovem o crescimento tumoral e a resistência aos diferentes compostos quimioterápicos. As células malignas do sangue aparentemente têm diferentes graus de dependência dos sinais do microambiente. A afinidade e dependência sobre as células estromais, para o crescimento e progressão tumoral, podem mudar com o tempo e com a evolução de clones dependentes ou independentes do estroma (Raaijmakers, 2011).

A quebra ou mesmo a dificuldade em se manter a sinalização heterotípica, entre as células-tronco hematopoiéticas e seus nichos, pode levar a uma quebra na manutenção da quiescência das primeiras. Esta quebra na quiescência pode levar a um aumento da proliferação celular, o que permite a aquisição de anormalidades genéticas, momento inicial para o processo de múltiplos passos para o início da leucemogênese (Raaijmakers, 2011).

A relação entre as células leucêmicas com o seu microambiente segue três padrões principais. O primeiro se refere à perda da intercomunicação com a rede do microambiente, que ocorre quando anormalidades genéticas dão às células transformadas uma vantagem na proliferação, tornando as células leucêmicas autônomas e independentes dos sinais do microambiente. O segundo se trata de uma disfunção do microambiente, onde a interação das células leucêmicas com as células do microambiente faz com que este forneça para as células malignas sinais de crescimento e resistência a drogas. Por exemplo, as células-tronco leucêmicas escapam do altamente regulado controle de crescimento e proliferação nos nichos hematopoiéticos, e parasitam o microambiente hematopoiético. O terceiro se

refere a uma “amigável” coexistência das células malignas com o seu microambiente. As interações entre as células malignas e as células do microambiente são muito parecidas com o padrão de interação das células hematopoiéticas normais com os seus respectivos microambientes. Conseqüentemente, a proliferação das células malignas é, ao menos inicialmente, dependente dos mesmos sinais externos do microambiente como citocinas e interações celulares (Burger *et al.*, 2009).

Dados recentes indicam que, em paralelo com os eventos oncogênicos no sistema hematopoiético, os nichos são responsáveis por sinais dominantes que, através de mecanismos moleculares, mantêm a quiescência (assim como para as células-tronco normais) facilitando a sobrevivência das “células-tronco” leucêmicas. Como para as células-tronco normais, os nichos osteoblásticos e varculares são críticos (Konopleva e Jordan, 2011).

1.4.2. CONTRIBUIÇÃO PARA A RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA

Diversos mecanismos celulares de resistência a drogas têm sido descritos, sendo que o melhor caracterizado é o fenótipo de resistência a várias drogas mediada pela glicoproteína-P. A glicoproteína-P é uma proteína transmembrana com alto grau de conservação entre as espécies e confere resistência cruzada a uma série de drogas citotóxicas não relacionadas. Esta proteína é um membro da superfamília de genes *ABC*, moléculas transportadoras com diversas funções de transporte (Chauncey, 2001; Marie, 2001). Embora muito importante este não é o único mecanismo utilizado pelas células para adquirirem resistência, existem muitos outros mecanismos como: aumento na expressão de outros transportadores celulares, alterações nas enzimas de desintoxicação, aumento no

processo de reparo do DNA, redução na produção dos metabólitos alvos da droga e alterações na regulação do ciclo celular e em vias apoptóticas (Den Boer *et al.*, 1998; Pieters *et al.*, 2003; Tissing *et al.*, 2003; Den Boer e Pieters, 2007).

Além dos mecanismos intrínsecos de resistência, deve-se considerar as células de LLA no seu local de origem, a medula óssea. Diversos autores mostraram, ao longo dos anos, que as interações das células leucêmicas com as células estromais são críticas para a sobrevivência e resistência a apoptose das células leucêmicas. Manabe *et al.* (1992 e 1994) mostraram que as células estromais são essenciais para a sobrevivência das células leucêmicas. Além disso, para a sobrevivência, o contato direto entre os tipos celulares é importante para prevenir a morte por apoptose. Langneaux *et al.* (1998) também mostraram para LLC que a cultura das células leucêmicas com as células estromais previne a apoptose e, além disso, pelo uso de anticorpos que bloqueavam o contato direto entre esses tipos celulares e pelo uso de meio condicionado de células estromais, pode-se demonstrar que o contato direto é essencial para a prevenção da apoptose.

Além disso, sabe-se que os diferentes tipos de leucemias se beneficiam da interação com o microambiente da medula para a resistência ao regime quimioterápico (Langneaux *et al.*, 1998; Shain *et al.*, 2000; Mudry *et al.*, 2000; Cheung e Van Ness, 2001; Moreno *et al.*, 2001). Em particular, sabe-se que o microambiente da medula óssea serve como sítio para as células leucêmicas residuais sobreviverem e resistirem à quimioterapia. A inibição das vias apoptóticas e parada do ciclo celular das células leucêmicas, mediado pelo microambiente, são uma das principais causas da resistência aos quimioterápicos que atuam nas células que estão ativamente se dividindo. Isto é particularmente relevante para que as células-tronco leucêmicas se mantenham quiescentes. Nos últimos anos, vários autores foram capazes de demonstrar que a interação dos blastos leucêmicos com as células

estromais da medula óssea aumenta a resistência da LLA à quimioterapia (Mudry *et al.*, 2000; Fortney *et al.*, 2001; Sarkar *et al.* 2002; Astier *et al.*, 2003; Pifer *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Clutter *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Dahl *et al.*, 2008; Iwamoto *et al.*, 2008;). Em alguns casos, pode-se dizer que o estroma ‘protege’ a leucemia da ação dos quimioterápicos.

Foi observado que as células estromais são capazes de sustentar a proliferação das células leucêmicas e atenuar os efeitos pró-apoptóticos, causados pela ação dos diferentes quimioterápicos, nas células leucêmicas. Este efeito protetivo ocorre pela interação entre moléculas presentes na superfície das células estromais (VCAM-1) e células leucêmicas (VLA-4) (Mudry *et al.*, 2000).

Diversos autores observaram um aumento nos sinais pró-apoptóticos quando as células leucêmicas eram expostas à ação dos diferentes compostos quimioterápicos. Entretanto, quando as células leucêmicas eram co-cultivadas com as células estromais, foi observado uma diminuição da atividade da caspase-3 (Fortney *et al.*, 2001), um aumento da atividade de PI3K e níveis de AKT fosforilado (Wang *et al.*, 2004), além de alterações promovidas na expressão de genes anti-apoptóticos (*BCL-2* e *BCL-x*) e pró-apoptóticos (*BAX*) (Pifer *et al.*, 2003).

Sarkar *et al.* (2002) mostraram que a estimulação da $\beta 1$ -integrina das células leucêmicas pela fibronectina aumentou os níveis de AKT fosforilado revertendo, desta forma, a apoptose nas células de LLA-B precursoras induzida pela doxorrubicina. Em 2003, Astier *et al.* avaliaram o perfil de expressão gênica temporal induzido pela ligação da $\beta 1$ -integrina com a fibronectina em células de LLA-B precursoras. Eles observaram que essa interação suprime a indução de genes pró-apoptóticos (caspases) e estimula a expressão dos genes anti-apoptóticos.

Dahl *et al.* (2008), investigaram o papel do TGF- β , BMP-6 e TIEG1 na comunicação das células estromais com as células de LLA. Neste estudo, eles observaram que a expressão de *TIEG1* é aumentada quando as células leucêmicas são estimuladas com TGF- β e BMP-6; mas também quando as células de LLA são co-cultivadas com as células estromais. O aumento da expressão *TIEG-1* resultou na inibição da proliferação e mais importante, tornou as células resistentes a ação do composto citostático AraC.

O estudo do microambiente tumoral, mais especificamente das moléculas mediadoras da interação do tumor com o microambiente circundante, tem permitido o desenvolvimento de novas drogas, anticorpos e peptídeos; que atualmente estão em fase de testes clínicos, com o intuito de inibir vários dos mecanismos de interação do tumor com as células normais do hospedeiro (Bissel e Radisky, 2001; Liotta e Kohn, 2001; Kerbel e Folkman, 2002; Bergers e Benjamin, 2003; Alessi *et al.*, 2004).

1.5. O SISTEMA IGF

O sistema das IGFs é basicamente constituído por dois polipeptídeos (IGF-I e IGF-II), uma bem caracterizada família de seis proteínas ligadoras de IGFs (IGF binding protein) de alta afinidade (IGFBP-1 a-6), uma dezena de proteínas ligadoras de IGFs (de baixa afinidade) relacionadas (IGFBP-rP-1 a-10), enzimas proteases que degradam as IGFBPs / IGFBP-rPs aumentando a biodisponibilidade dos ligantes, e três receptores na superfície das células (receptor de insulina, IGF1R e IGF2R) (Pollak *et al.*, 2004).

Diferentemente da maior parte dos hormônios polipeptídicos e fatores de crescimento, as IGFs circulam no organismo ligados à IGFBPs (e IGFBP-rPs) específicas.

As funções fisiológicas atribuídas as IGFBPs / IGFBP-rPs não se restringem única e exclusivamente ao transporte das IGFs através dos fluidos biológicos. Inúmeras outras funções são atribuídas as IGFBPs / IGFBP-rPs, dentre elas: i) aumento da meia vida das IGFs (tipicamente passando de alguns minutos para horas); ii) modulação do acesso das IGFs aos seus receptores e por consequência a regulação de suas atividades; iii) capacidade de regular o crescimento, migração ou metabolismo celular de uma maneira independente das IGFs. Em relação a essa última função, tudo indica que essa atividade é desencadeada por meio de interações diretas entre as IGFBPs /IGFBP-rPs e os receptores celulares ou proteínas de interação, o que em outras palavras indica que essa função é independente das IGFs (Rosenfeld *et al.*, 1999).

A insulina e IGF1 exercem sua função pela ligação a receptores transmembrana, a saber, o receptor da insulina (IR) e os receptores de IGFs, IGF1R e IGF2R (**Figura 3**). O receptor da insulina (IR) é composto por duas cadeias alfa e duas cadeias beta, ambas codificadas pelo gene *INSR*. A cadeia alfa pode conter ou não um trecho de 12 aminoácidos codificado pelo éxon 11 do gene *INSR*. De forma geral, as células hematopoiéticas expressam a isoforma sem esses 12 aminoácidos, ou seja, a isoforma IR-A do receptor de insulina, que é a mesma isoforma expressa no feto, no câncer e no sistema nervoso central. Ao contrário da isoforma IR-B (contém o éxon 11) que liga somente a insulina e regula principalmente o metabolismo da glicose nos músculos, tecido adiposo e fígado (Genua *et al.*, 2009). Os nossos dados de microarranjos de LLA mostram que o éxon 11 do *INSR* é bem menos expresso que os demais éxons, indicando a prevalência da isoforma IR-A nestes tipos celulares (**Figura 4**).

O IGF1R atua mais na sobrevivência e proliferação celular do que no metabolismo da glicose (Genua *et al.*, 2009). Como esquematizado na Figura 3, o IGF1R forma híbridos

com o IR-A (HR-A) e IR-B (HR-B). O HR-A liga as IGFs e insulina. O HR-B liga principalmente IGF1, mas também o IGF2. A expressão de HR-B torna as células menos sensíveis aos efeitos mitogênicos de IGFs e insulina. Já a expressão de HR-A sensibiliza as células aos efeitos mitogênicos desses fatores (Genua *et al.*, 2009).

O IGF2R (ou IGF1/M6P) liga IGF2 e com baixa afinidade também o IGF1, mas não liga insulina. Ao contrário dos outros receptores, o IGF2R não tem domínio catalítico e sua função consiste na internalização e transporte dos ligantes extracelulares, via endossomos, para processamento ou degradação. No caso do IGF2, a ligação ao IGF2R resulta em internalização e degradação, de tal modo que o IGF2R é tido como um supressor tumoral (El-Shewy e Luttrell, 2009).

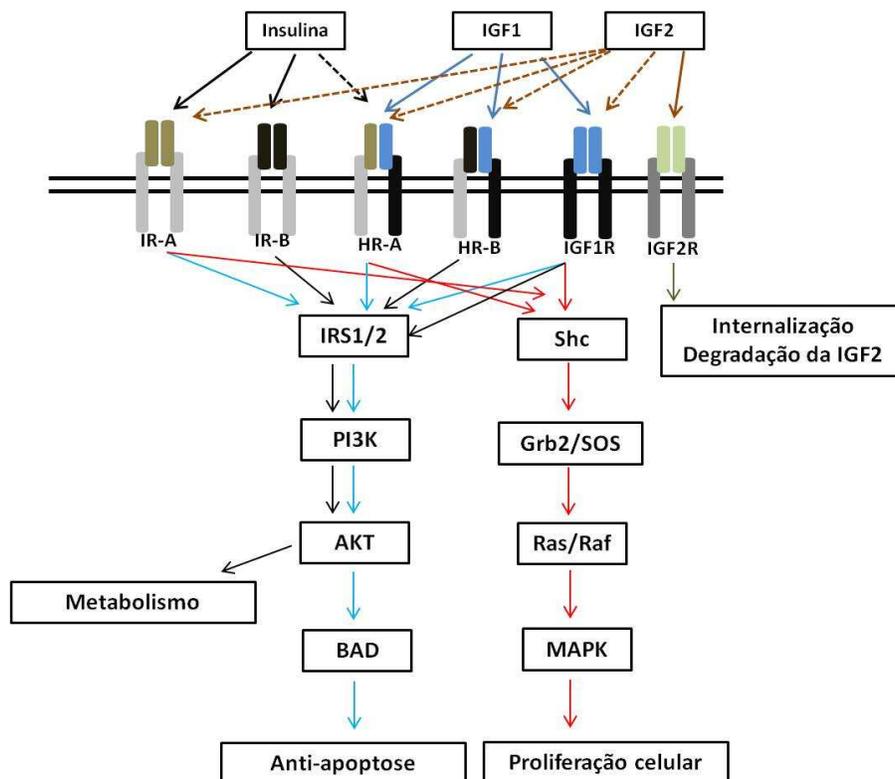


Figura 3. Esquema simplificado das vias de sinalização da insulina, IGF1 e IGF2 e seus receptores. Modificado de Genua *et al.* (2009).

No caso do IR, IGF1R e HR, o ligante leva à aproximação da região intracelular do receptor (cadeias beta) e autofosforilação (em cis e em trans), seguido pelo deslocamento da alça de ativação e liberação do sítio catalítico para o acesso de ATP e ancoragem das proteínas IRS (IRS1 a IRS4) e Shc, entre outras. A fosforilação de IRS permite o recrutamento de p85 e ativação da via PI3K/AKT. Além disso, o IRS fosforilado recruta também o complexo Grb2:SOS e ativa a via MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK). A fosforilação de Shc também ativa a via MAPK. Em suma, a sinalização de IR/IGF1R/HR ocorre por duas vias principais, a via do PI3K/AKT e a via Ras/MAPK (**Figura 3**) (Jensen e De Meyts, 2009).

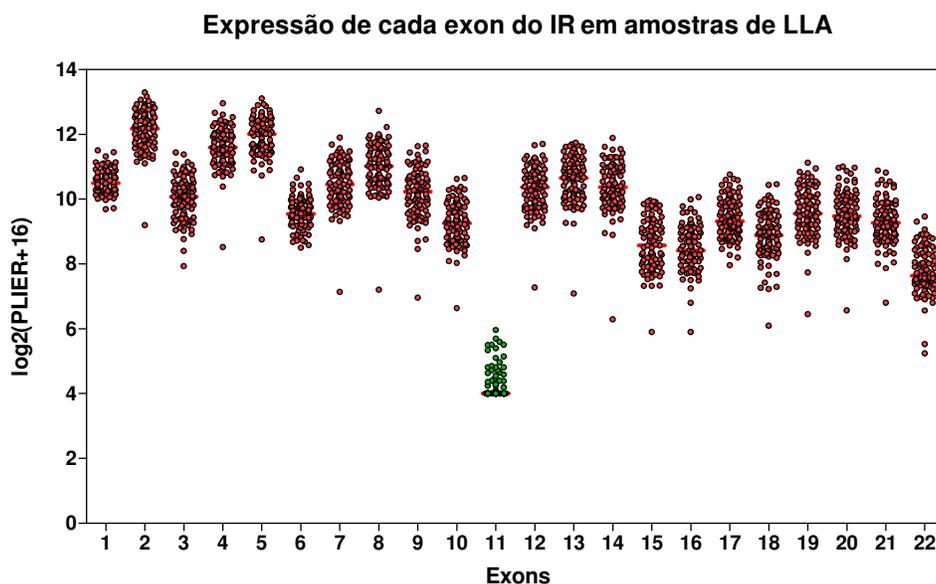


Figura 4. Nível de expressão dos diferentes éxons do gene do receptor de insulina em diferentes amostras de LLA pediátrica. A expressão gênica foi avaliada com microarrays Gene1.0 ST (Affymetrix) e analisada com o programa Bioconductor usando algoritmo Plier16. Cada ponto corresponde ao valor de expressão em um paciente diferente. Notar que a expressão do éxon 11 é desproporcionalmente inferior (6 vezes na escala log₂, que corresponde a 100 vezes em escala linear) aos demais.

1.5.1. IGFS/INSULINA E SEUS RECEPTORES

As IGFs são essenciais para o crescimento e desenvolvimento embrionário e pós-natal. Ao contrário de outros peptídeos hormonais, que são produzidos e armazenados em tecidos específicos, as IGFs são produzidas por praticamente todas as células do corpo. Elas são únicas entre os diversos fatores de crescimento, pois podem atuar sistemicamente como um hormônio, mas também localmente como fatores autócrinos ou parácrinos (Dawczynski *et al.*, 2003). O crescimento fetal é determinado de forma direta pelas IGFs produzidas indistintamente por vários tecidos fetais, enquanto que nas crianças, os níveis de IGFs são regulados pelo hormônio do crescimento, que controla a produção de IGF1 pelo fígado (El-Shewy e Luttrell, 2009). Além disso, altos níveis séricos de IGF1 e elevado peso ao nascimento estão correlacionados com a ocorrência de LLA pediátrica, hipótese conhecida com “Big Babies” (Ross *et al.*, 1996).

Ao longo dos anos, foi demonstrado que IGFs e insulina são fatores de sobrevivência para um grande número de tipos celulares (Schofield e Engstrom, 1992), mas também tem um papel muito importante na progressão e desenvolvimento de diversos tipos tumorais (Leal *et al.*, 1999; Sachdev e Yee, 2001; Marshman e Streuli, 2002; Leroith e Roberts, 2003).

Diversos trabalhos mostraram que a insulina e a IGF1, via IR e IGF1R, podem atuar de forma autócrina e parácrina em células de LLA promovendo o crescimento e proliferação destes tipos celulares. Os mais elevados níveis de expressão do *IGF1R*, em células de LLA-B ou LLA-T, se mostraram relacionados com os fenótipos mais imaturos (Estrov *et al.*, 1991; Baier *et al.*, 1992a; Baier *et al.*, 1992b; Neely *et al.*, 1992; Leverrier *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2000; Tu *et al.*, 2000). Medyouf *et al.* (2011), observaram em

linhagens de LLA-T, que a inibição ou a deleção de IGF1R bloqueou o crescimento e a viabilidade das células leucêmicas. Além disso, observaram que para a manutenção de elevados níveis de expressão de *IGF1R* é necessário a sinalização via Notch1.

Hox consiste em uma família de genes que são expressos preferencialmente durante o desenvolvimento embrionário e na hematopoiese. No caso da hematopoiese o papel destes genes está relacionado com o controle e manutenção da proliferação e diferenciação das células-tronco. Leucemias da linhagem linfóide ou mielóide apresentam uma desregulação na expressão do gene *HoxA9*. Os casos de LLA-T ou B com alteração do gene MLL apresentam um aumento na expressão do gene *HoxA9*. Whelan *et al.* (2008), demonstraram que a expressão de *HoxA9* está relacionada com a indução de expressão de *IGF1R* e consequentemente com a proliferação das células leucêmicas estimuladas com IGF1.

A interconexão das vias de sinalização intracelular contribui para que a insulina/IGFs atuem de maneira diferente em contextos celulares diferentes. Sabe-se, por exemplo, que o IGF1 potencializa o efeito da IL-7 na proliferação (Billips *et al.*, 1992; Gibson *et al.*, 1993) e diferenciação (Landreth *et al.*, 1992) de precursores de linfócitos B murino em sistema de co-cultura com estroma.

Tamburini *et al.* (2008), ao usarem um derivado da rapamicina para inibir mTOR, observaram um aumento na fosforilação do AKT em células de LMA. A fosforilação do AKT ocorria devido a um *looping* autócrino na via da IGF1-IGF1R, já que as células blásticas expressam receptores funcionais de IGF1 e mantêm uma produção autócrina deste mesmo fator. Portanto, a via do IGF1R funciona como um mecanismo compensatório na LMA para restauração da via de PI3K e resistência celular. Neste contexto demonstrou-se

que a inibição do IGF1R leva à inibição da proliferação e sensibilização das células de LMA a quimioterapia (Wahner *et al.*, 2009; Chapuis *et al.*, 2010; He *et al.*, 2010).

1.5.2. IGFBP7 E INSULINA/IGFS

A IGFBP7, também denominada TAF (tumor-derived adhesion factor) ou mac25 (meningioma-associated cDNA 25), foi classificada como IGFBP-rP1 (IGFBP related protein) pela baixa afinidade de ligação às IGFs ou insulina. A baixa afinidade de ligação faz com que a IGFBP7 não compita com os receptores de IGFs ou insulina, e ao mesmo tempo é capaz de aumentar a meia vida destes ligantes, e consequentemente as atividades mitogênicas desses fatores de crescimento (Akaogi *et al.* 1996a). Além do seu papel na proliferação de fibroblastos, dados recentes têm relacionado à IGFBP7 como tendo um efeito estimulatório na adesão, migração e proliferação de diversos tipos tumorais (Jiang *et al.*, 2008; Georges *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011).

Entretanto, alguns autores têm atribuído à IGFBP7 propriedades de supressor tumoral, tais como inibição da proliferação e indução de senescência celular (Wajapeyee *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Benatar *et al.*, 2011), inclusive para o caso da leucemia linfóide aguda (LLA) de linhagem T (LLA-T) (Heesch *et al.*, 2010). O aparente conflito encontrado na literatura, sobre o papel da IGFBP7, pode decorrer dos diferentes contextos celulares, além das diferenças nos sistemas de cultura utilizados por cada autor, que serão discutidos na seção de “Resultados e Discussão”.

Embora as funções biológicas da IGFBP7 ainda não estejam totalmente esclarecidas, diversos estudos reportam diferentes funções para essa proteína. Como relatado anteriormente, essa proteína apresenta atividades dependentes e independentes das

IGFs. Além da atividade dependente das IGFs já mencionadas, sabe-se que a IGFBP7 liga-se a diferentes componentes da matriz extracelular como: colágenos tipo II, IV e V; heparan-sulfato; e glicosaminoglicanas; mediando a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (Akaogi *et al.*, 1996b; Sato *et al.*, 1999).

A IGFBP7 acumula nos pequenos vasos sanguíneos tumorais (Akaogi *et al.*, 1996b) e tecidos linfóides secundários, mas não nos vasos sanguíneos de tecidos não-linfóides normais (Girard *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2000). Além disso, estimula a secreção de prostaciclina pelas células endoteliais e tem sido implicada na angiogênese e/ou modulação das funções vasculares (Akaogi *et al.*, 1996a; Sato *et al.*, 1999). Finalmente, ensaios de imunolocalização ultra-estrutural revelaram a IGFBP7 associada com microvilosidades próximas as junções das células endoteliais (Girard *et al.*, 1999), sugerindo um papel na regulação dos tráfego de linfócitos, que foi ainda corroborada pela constatação de que a IGFBP7 também se liga a diversas quimiocinas como: SLC, CCL21, IP-10, CXCL10 e RANTES (Nagakubo *et al.*, 2003).

Em relação ao câncer, o aumento de *IGFBP7* em diferentes tipos tumorais como câncer de mama inflamatório (Biéche *et al.*, 2004), mesotelioma (Sun *et al.*, 2005), câncer de próstata (Degeorges *et al.*, 1999; Osman *et al.*, 2006) e câncer cólon-retal (Adachi *et al.*, 2001; Shao *et al.*, 2004) estão associados com um mau prognóstico.

Finalmente para o caso da LLA, cabe citar o trabalho de Holleman *et al.* (2004), que incluiu a análise de 173 casos de crianças com LLA-B precursora. Neste estudo, os autores associaram o nível de resistência das células leucêmicas, a diferentes compostos quimioterápicos, com o perfil de expressão gênica destes tipos celulares. Desta forma, foi possível separar grupos de genes que estariam relacionados com a resistência e grupos de genes relacionados com a sensibilidade a cada um dos quatro agentes antileucêmicos

estruturalmente diferentes e extensamente usados (prednisona, vincristina, asparaginase e daunorubicina). Neste primeiro estudo foi possível associar a expressão do *IGFBP7* com resistência a asparaginase. Além disso, estudos *in vitro* realizados com uma ampla gama de linhagens tumorais ('NCI panel'), reportam que a expressão (mRNA) de *IGFBP7* encontra-se positivamente associada à resistência a outros quimioterápicos. Daí *et al.* (2006) associaram o *IGFBP7* com resistência a tetraplatina, metotrexato, fluororacil, acivicina. Com exceção da tetraplatina, os outros são todos inibidores metabólicos que atuam na síntese de purinas e pirimidinas. Györfi *et al.* (2006) associaram o *IGFBP7* com resistência a metotrexato, aos inibidores de topoisomerase, topotecan e etoposídeo, e aos intercalantes de DNA mitoxantrona e doxorubicina. Finalmente, Selga *et al.* (2009) associaram o *IGFBP7* com resistência a metotrexato.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo investigar o papel da IGFBP7 na interação da leucemia com as células estromais da medula óssea e na resistência à quimioterapia.

Mais especificamente, objetivou-se:

1. Investigar o papel do estroma da medula óssea na modulação da expressão de 5 genes relacionados com a resistência e sensibilidade à asparaginase, entre os quais o *IGFBP7*.
2. Estudar o papel da IGFBP7 (*in vitro*) na sobrevivência e proliferação das células de leucêmicas e células do estroma da medula óssea.
3. Investigar o papel da IGFBP7 e/ou insulina/IGF1 na resistência da leucemia à ação da quimioterapia.
4. Tecer associações entre expressão do *IGFBP7* e dados clínico-biológicos de pacientes portadores de LLA.

3. MANUSCRITO



ORIGINAL ARTICLE

IGFBP7 participates in the reciprocal interaction between acute lymphoblastic leukemia and BM stromal cells and in leukemia resistance to asparaginase

ABA Laranjeira¹, JF de Vasconcellos¹, L Sodek², MC Spago³, MC Fornazim³, LG Tone⁴, SR Brandalise^{1,5}, AE Nowill³ and JA Yunes^{1,6}

The interaction of acute lymphoblastic leukemia (ALL) blasts with bone marrow (BM) stromal cells (BMSCs) has a positive impact on ALL resistance to chemotherapy. We investigated the modulation of a series of putative asparaginase-resistance/sensitivity genes in B-precursor ALL cells upon coculture with BMSCs. Coculture with stromal cells resulted in increased insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 7 (IGFBP7) expression by ALL cells. Assays with IGFBP7 knockdown ALL and stromal cell lines, or with addition of recombinant rIGFBP7 (rIGFBP7) to the culture medium, showed that IGFBP7 acts as a positive regulator of ALL and stromal cells growth, and significantly enhances *in-vitro* resistance of ALL to asparaginase. In these assays, IGFBP7 function occurred mainly in an insulin- and stromal-dependent manner. ALL cells were found to contribute substantially to extracellular IGFBP7 levels in the conditioned coculture medium. Diagnostic BM plasma from children with ALL had higher levels of IGFBP7 than controls. IGFBP7, in an insulin/IGF-dependent manner, enhanced *asparagine synthetase* expression and asparagine secretion by BMSCs, thus providing a stromal-dependent mechanism by which IGFBP7 protects ALL cells against asparaginase in this coculture system. Importantly, higher *IGFBP7* mRNA levels were associated with lower leukemia-free survival (Cox regression model, $P = 0.003$) in precursor B-cell Ph(-) ALL patients ($n = 147$) treated with a contemporary polychemotherapy protocol.

Leukemia advance online publication, 18 October 2011; doi:10.1038/leu.2011.289

Keywords: IGFBP7; acute lymphoblastic leukemia; bone marrow stromal cells; asparaginase; drug resistance; insulin

INTRODUCTION

Substantial successes have been achieved in the treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). However, relapse still occurs in around 20% of patients. A large number of studies have shown that the persistence of blasts in the peripheral blood or bone marrow (BM) after the first weeks of treatment is highly predictive of relapse.¹ An early response to therapy reflects both the intrinsic resistance of leukemic cells to antileukemic agents^{2,3} and host factors related to drug pharmacodynamics.⁴

Several genetic abnormalities are known to contribute to the development of ALL and in some cases, such as the t(9;22) translocation or in infants with *MLL* gene rearrangements, there is also a higher *in-vitro* drug-resistance phenotype^{5,6} and rate of treatment failure.^{7,8} Conversely, there are also genetic abnormalities, like the t(12;21) translocation, which have been reported to be associated with a more favorable drug uptake and chemosensitivity.^{9,10}

Although it is likely that resistance to chemotherapy is mainly determined by the intrinsic genetic characteristics of leukemic cells, several mechanisms that confer drug resistance in ALL cells in the BM may be also modulated by leukemia-host interactions. Several authors have shown that the interaction of ALL blasts with BM stromal cells (BMSCs) has a positive impact on leukemia cell survival^{11–16} and enhances ALL resistance to chemotherapy.^{17–22}

Very little is known about the molecular mechanisms that contribute to stromal-induced ALL chemoresistance. Interactions with stromal vascular cell adhesion molecule 1 cell adhesion molecules render VLA-4+ leukemic cell lines resistant to Ara-C and VP-16 (etoposide).¹⁷ Stromal cells protect ALL cell lines from the pro-apoptotic effect of chemotherapy by inducing the activation of the PI3K²¹ and AKT²¹ survival pathways and by downregulating caspase 3 activity.¹⁸ In addition, vascular endothelial growth factor produced by stromal cells stimulates Bcl-2 phosphorylation and resistance of ALL cell lines to different chemotherapeutic agents.²³ More recently, Iwamoto *et al.*²² showed that stromal cells (BM mesenchymal cells) synthesize and secrete asparagine in sufficient amounts to protect ALL cells, both cell lines and primary cells, from asparaginase cytotoxicity.

Microarray analysis in combination with *in-vitro* drug sensitivity assays of diagnostic ALL samples were used to identify different sets of genes with expression patterns linked to sensitivity or resistance to prednisolone, vincristine, asparaginase and daunorubicin.²⁴ We reasoned that some of these genes could also be involved in the stromal-induced ALL chemoresistance. In this manuscript, we investigated the stromal modulation of a series of putative asparaginase-resistance/sensitivity genes in primary B-lineage ALL cells. Coculture with stromal cells induced the upregulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 7

¹Centro Infantil Boldrini, Laboratório de Biologia Molecular, Campinas, SP, Brazil; ²Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil; ³Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas da Infância, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil; ⁴Department of Pediatrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Child Care and Pediatrics, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ⁵Departamento de Pediatria, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil and ⁶Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil. Correspondence: Dr JA Yunes, Centro Infantil Boldrini, Laboratório de Biologia Molecular, Rua Dr. Gabriel Porto, 1270, Barão Geraldo, Campinas, 13083-210 SP, Brazil.
E-mail: andres@boldrini.org.br

Received 23 November 2010; revised 19 August 2011; accepted 6 September 2011

(IGFBP7) in ALL cells, a gene that has been previously associated with asparaginase-resistant ALL.²⁴ A series of experiments with IGFBP7 knockdown ALL and stromal cell lines and with addition of recombinant IGFBP7 (rIGFBP7) to the culture medium were carried out to investigate the possible contribution of IGFBP7 on ALL resistance to asparaginase. Evidence was found that rIGFBP7:insulin (or rIGFBP7:IGF-1 or :IGF-2) stimulates the expression of *asparagine synthetase* (*ASNS*) and the secretion of asparagine by BMSCs, providing one possible mechanism by which IGFBP7 protect ALL cells against asparaginase in this coculture system.

MATERIALS AND METHODS

Leukemia, BMSCs and mesenchymal stem cells

Primary leukemia samples used for *in-vitro* assays were cryopreserved BM mononuclear cells obtained from patients with a newly diagnosed B-lineage ALL and with a diploid karyotype and/or DNA index of 1 ± 0.1 (Supplementary Table 1). Samples were used if thawed vials yielded > 90% of viable cells, as judged by Trypan blue staining. The prognostic impact of *IGFBP7* transcript levels was evaluated in post-ficoll BM mononucleated cells, stored at -70°C in guanidine solution, from 181 ALL patients that entered treatment from January 2002 to the end of July 2007 at Centro Infantil Boldrini. Patients were treated according to the Brazilian GBTLI-99 Childhood ALL Treatment protocol.²⁵ Normal BM samples were obtained from healthy transplant donors included as controls. Diagnostic BM aspirate smears were used to estimate the leukemic blasts concentration in BM: three different areas of $164 \times 206 \mu\text{m}$ were photographed at the microscope, nucleated cells were counted, using the NIS-Elements AR software (Nikon, Tokyo, Japan), and corrected according to blasts percentage. BM blast percentages ranged from 40 to 98% (median 90%, interquartile 75–95%). Median blast cell concentrations in BM were 138.3 (interquartile range 62.64–274.9). The study was approved by the Research Ethics Committees from both Centro Infantil Boldrini and State University of Campinas.

BMSCs were obtained from donor BM mononucleated cells as described.¹² Cells at passages 1–3 were used in the experiments. Coculture experiments with ALL cell lines were performed with the use of hTERT (telomerase reverse transcriptase) immortalized mesenchymal stem cells (MSCs),²⁶ kindly provided by Dr Dario Campana (St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA). The leukemia cell lines 697, RS4;11 and REH were kindly provided by Dr Sheila A Shurtleff (St Jude Children's Research Hospital) and Nalm6 by Dr Angelo Cardoso (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA). MSCs and ALL cell lines were maintained in RPMI-1640 containing 10% fetal calf serum (RPMI-10%).

shRNA knockdown of IGFBP7 in RS4;11, REH, 697, and MSCs cells *IGFBP7* expression was downregulated by stable transfection of ALL cell lines and MSCs with the pLKO.1 MISSION shRNA lentiviral vector NM_001553.1-959s1c1 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The IGFBP7 shRNA sequence corresponds to nucleotides 959–979 (NM_001553.1). As negative control, cells were transduced with the MISSION Non-Target shRNA Control Vector (Sigma-Aldrich). Vesicular stomatitis virus-pseudotyped lentiviral vectors were produced by transient transfection of the MISSION vector in conjunction with pMDLg/pRRE, pRSV-Rev and pMD2.G vectors, into 293T cells. Conditioned medium containing lentivirus were harvested and used for infection of cells. After 72 h, infected RS4;11, REH, 697 and MSCs cells were selected with 1.5, 2.5, 1.5 or 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin, respectively, during 20 days, and bulk cells were used for the experiments. For experiments, cells were cultured without puromycin for 1 week.

Coculture and gene expression analysis

BMSCs were grown to subconfluence in 6-well plates. Immediately before initiating the experiments, the medium was removed and the cells were washed twice with 2 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and once with AIM-V serum-free culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cryopreserved primary ALL cells were thawed, washed in AIM-V and 10×10^6 cells

were seeded onto BM stromal layers in 5 ml AIM-V medium, and incubated at 37°C and 5% CO_2 . In the case of cell lines, ALL cells were starved overnight in RPMI-1640 serum-free medium, pelleted and 5×10^6 cells/well were seeded onto subconfluent MSCs in serum-free RPMI-1640. At predetermined times of coculture, ALL cells were collected by pipetting and scraping the bottoms of wells, and washed twice with PBS. Collected ALL cells were used for RNA extraction. For certain experiments, tightly adherent ALL cells were recovered from BM stromal layers by the addition of a solution containing 0.25% trypsin and incubation at room temperature under continued microscopy inspection in order to avoid detachment of BMSCs. To address the possible influence of cell viability on gene expression results, matched primary ALL samples (3×10^5 cells) were seeded in triplicate onto confluent BM stromal layers in 96-well plates in 200 μl of coculture medium and then collected at various time points (6 h, 1 day, 2 days and 3 days) for the analysis of number of viable cells by trypan blue dye exclusion.

One microgram of total RNA was used for cDNA synthesis with 100 ng of random hexamers and the ImProm II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). cDNA quality was evaluated by a multicontrol PCR assay.²⁷ The quantitative assessment of gene transcripts was made by real-time PCR (RQ-PCR) on an ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using the SYBR green method. Standard curves were prepared by serial dilutions of PCR products from 10^8 to 10^3 molecules. Absolute gene transcript values were normalized with respect to the number of *ABL* transcripts.²⁸ Primers and the PCR protocol are presented in Supplementary Methods.

Stromal cell treatment with IGFBP7 and/or its ligands

BMSCs were cultured to confluence in appropriate culture medium (see above) and then washed and incubated overnight in AIM-V. In the following day, different combinations of rIGFBP7 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) at 100 ng/ml, IGF1 (R&D Systems) at 200 ng/ml, IGF2 (R&D Systems) at 200 ng/ml and insulin (Novolin N, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) at 500 ng/ml were added. After 6 h of incubation, medium was removed and cells were lysed by TRIZOL addition to the plates. Treatments were done in triplicate. Cell lysates were used for RNA extraction and gene expression analysis.

Measurement of amino-acid concentrations in culture media

BMSCs were cultured to confluence, washed and incubated for 24 or 48 h in serum-free, asparagine-free MEM medium (Cultilab, Campinas, Brazil) supplemented with different combinations of rIGFBP7, IGF1, IGF2 and insulin (same concentrations as above). After the incubation period, the culture media were recovered and detached cells were pelleted by centrifugation. Amino acids were separated and analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography as their α -phthalaldehyde derivatives, as previously described.²⁹

Flow cytometry analysis of intracellular IGFBP7 expression

Primary ALL cells (1×10^6 cells) or starving ALL cell lines (0.1×10^6 cells) were cultured with and without BMSCs or MSCs in 24-well plates in 1 ml of AIM-V or RPMI-1640 serum-free medium, respectively, as described above. After 24 h, ALL cells were recovered, washed with PBS/0.5% bovine serum albumin (PBS/BSA), blocked in PBS containing 2% human AB serum, labeled with CD19-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) and fixed in 0.5% paraformaldehyde. Cells were then washed, permeabilized for 10 min with PBS/BSA/0.5% saponin and labeled with goat polyclonal antibody anti-IGFBP7 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Cells labeled with the primary antibody plus blocking peptide were used as control. After washing with PBS/BSA/saponin, cells were labeled with the secondary donkey anti-goat IgG F(ab')₂-APC (Santa Cruz Biotechnology), washed and fixed in paraformaldehyde. Cells were analyzed with a FACSCanto flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using the BDFACSDiva Software (Becton Dickinson). A 'gate' was designed around the area of the light-scatter dot plot (forward scatter vs side scatter) in which the majority of live leukemic cells were found, excluding

apoptotic cells, cell debris and aggregates. Apoptotic cells accumulate as an additional population, of decreased volume and increased density, in the forward scatter vs side scatter plots,³⁰ and therefore were easily excluded from the count. Only CD19(+) cells were analyzed with respect to intracellular IGFBP7 labeling. Cells labeled with primary antibody plus blocking peptide (Santa Cruz Biotechnology) were used as negative control.

ELISA

IGFBP7 levels in culture media and patients' BM plasma were measured using sandwich ELISA, as described elsewhere.³¹ The group of patient's BM plasma samples had only a partial overlap ($n = 42$) with BM mononuclear cells used for gene expression analysis. Stable MSC cell lines expressing sh.IGFBP7 or sh.Scrambled were grown to 50% confluence (3000 cells) in 96-well plates in RPMI-10%. Immediately before initiating the experiments, the medium was removed and the cells were washed twice with serum-free RPMI-1640. Stable ALL cell lines expressing sh.IGFBP7 or sh.Scrambled were grown in RPMI-10%, washed in serum-free RPMI-1640 and 1×10^5 or 5×10^5 cells were seeded onto the subconfluent MSC layers in 100 μ l serum-free RPMI-1640 medium, and incubated at 37 °C and 5% CO₂. After 24 h, the culture media were recovered and centrifuged, and the supernatant was used for ELISAs.

Cell survival/proliferation assays

Primary B-precursor ALL cells (2×10^5 cells) were seeded onto subconfluent BMSC or MSC layers, or as described above, in 96-well plates in 100 μ l of AIM-V medium supplemented with different combinations of asparaginase (0.9 IU/ml), rIGFBP7 (100 ng/ml) and insulin (500 ng/ml). Similar experiments were performed with ALL cell lines (5×10^4 cells/well), cultured with and without MSCs in RPMI-10%. After incubation for 48 h, cells were harvested by pipetting and scraping the bottoms of wells, pelleted by centrifugation, resuspended in PBS/BSA and incubated on ice for 30 min with the CD19-FITC antibody (BD Pharmingen). After one wash in PBS, cells were resuspended in 300 μ l PBS, 10 μ l of CountBright Absolute Counting Beads (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added and samples were analyzed by flow cytometer using a forward scatter vs side scatter 'gate' for viable cells, as described above.³⁰ The number of viable CD19(+) cells per 3000 beads events was recorded. All treatments were done in triplicate. Similar experiments were performed but recovered cells were labeled with Annexin V and propidium iodide. Briefly, cells were resuspended in the appropriate binding buffer, stained with Annexin V Alexa Fluor 488 conjugated (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and propidium iodide at room temperature for 15 min, and subsequently analyzed by flow cytometry, and the absolute number of Annexin-negative cells per 3000 beads events was recorded.

Statistical analysis

IGFBP7 mRNA expression values had a positively skewed distribution and were transformed into logarithmic values. The association of IGFBP7 expression levels (natural logarithmic values) with clinical and biological features was determined by the Mann-Whitney test. When necessary, continuous variables were considered using previously defined discrete categories. Survival analysis included 153 precursor B-cell ALL patients, negative for the BCR-ABL translocation. Of these, six patients died during induction due to sepsis ($n = 4$) or hemorrhagic disorders ($n = 2$) and were excluded from the analysis. Leukemia-free survival (LFS) denotes period of time from remission date to any relapse ($n = 7$). Failure to enter remission due to refractory disease ($n = 3$) was considered an event at zero time. Patients who died in remission ($n = 7$) were censored on the day of death. Patients still alive and without any relapse were censored at last follow-up. A patient who had BM transplantation in first remission was censored at the day of transplantation. The median follow-up period for patients who did not have an event was 3.9 years (interquartile range 2.65–5.04 years). The Cox regression model was used to test the prognostic influence of IGFBP7 expression as a continuous variable as well as to adjust for the effect of other variables (gender, age, white blood cell count at diagnosis,

presence of the TEL-AML1 translocation, CD10 immunophenotype, BM status at day 28 and risk group). Backward elimination procedure was employed. The Wald's test was used to determine whether variables should be dropped from the multivariate model. Alpha errors of $P = 0.05$ and $P = 0.1$ were tolerated in univariate analyses and the multivariate model, respectively. The SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) softwares were used throughout.

RESULTS

The asparaginase-resistance/sensitivity genes analyzed in this study were selected from the work of Holleman *et al.*²⁴ according to the reported ratios of the median expression in drug-resistant vs drug-sensitive B-lineage ALL cells (R/S ratio). Five genes were selected, including two sensitivity genes (R/S ratio < 1.0), *GPR56* and *MAN1A1*, and three resistance genes (R/S ratio > 1.0), *SCGF*, *IGFBP7* and *GATA3*. Gene expression was analyzed in a series of 12–17 clinical samples of pediatric B-lineage ALL before and after 6 h of culture on allogeneic BM stromal layers. As shown in Figure 1a, both the *GPR56* and *MAN1A1* sensitivity genes were downregulated in ALL cells after 6 h of culture on the stromal layer. On the other hand, two (*IGFBP7* and *GATA3*) of the three drug-resistance genes were upregulated after culture with stromal cells. After 3 days of culture on BM stromal layers, half (9 out of 17) of the ALL samples demonstrated some degree of proliferation. In contrast, in 3/17 and 5/17 of cases, the number of viable ALL cells remained constant or decreased, respectively, as judged by trypan blue exclusion (data not shown). No association could be found between ALL survival/proliferation in culture and the expression of the five drug-sensitivity/resistance genes.

IGFBP7/mac25/IGFBP-rP1 was selected for subsequent studies based upon its fold upregulation, its soluble or extracellular activity and the availability of rIGFBP7 protein. During the course of the experiments, we noticed that substantial numbers of primary ALL cells remained tightly associated with the BM stromal layer after the washing procedure. Since IGFBP7 was reported to display cell adhesion activities,^{32–34} we speculated whether its expression could be linked to the different adhesion phenotypes of ALL cells. As shown in Figure 1b, no statistically significant differences could be found between the expression of IGFBP7 and the adhesion phenotypes of ALL cells, even though a small trend was seen toward higher expression in highly adherent cells. Importantly, simply culturing ALL cells without the stromal layer resulted in IGFBP7 downregulation in comparison with the levels found at time zero. Consistent with RQ-PCR results, the intracellular expression of IGFBP7 antigen in ALL cells was significantly upregulated after culture on BM stromal layers, as indicated by the median fluorescence intensity of labeled cells (Figure 1c).

To test the observations made with primary ALL cells, experiments were performed with ALL cell lines, which survive equally well with and without BM stromal layers. Upregulation of IGFBP7 was seen in the four different ALL cell lines tested (NALm6, REH, RS4;11 and 697), upon coculture with hTERT-MSCs (MSCs),²⁶ a BM-derived stromal cell line, compared with medium alone (Supplementary Figure 1).

Autocrine effect of IGFBP7 on ALL cells

IGFBP7 was first described as an enhancer of the mitogenic activities of IGFs and insulin.³⁵ Since ALL cells respond to IGFs and/or insulin stimulation,^{36–41} the leukemia-derived IGFBP7 could work as an autocrine factor. To investigate this possibility, the ALL cell lines REH, RS4;11 and 697 were stably transduced with lentiviral particles carrying shRNA constructs directed against IGFBP7 (sh.IGFBP7) or a non-coding random sequence (sh.scrambled). Expression of IGFBP7 was decreased to equivalent

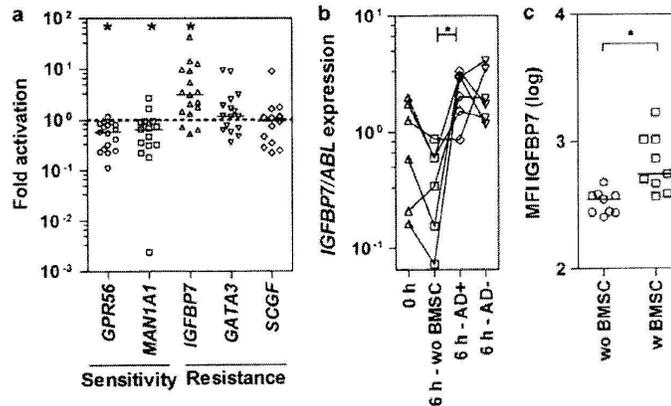


Figure 1. Upregulation of the *IGFBP7* transcript and protein levels in primary ALL cells upon culture on BM stromal layers. (a) Expression levels of the five genes identified by Holleman *et al.*²⁴ as associated with asparaginase-sensitive/resistant ALL patients were determined by RQ-PCR in cryopreserved B-lineage ALL cell samples immediately after thawing or after 6 h of culture on BM stromal layers in AIM-V medium. Gene transcript values were normalized with respect to the number of *ABL* transcripts. Values are gene expression levels of individual patient's samples after 6 h of culture on BM stromal layers relative to that obtained at time zero (no culture). Values above the dashed line indicate those cases where gene expression was upregulated upon coculture, whereas values under the dashed line represent downregulated genes ($*P < 0.05$; Wilcoxon signed-rank test comparing column median values with the hypothetical value of 1). Horizontal bars correspond to the median. (b) Expression of *IGFBP7* in primary ALL cells after 6 h of culture in medium alone or onto BM stromal layers. Different wash stringencies were used to discriminate free and weakly adherent ALL cells (AD⁻) from the tightly adherent ones (AD⁺). Lack of contamination by stromal cells in the harvested ALL cells was certified by the lack of amplification (Ct value > 30.0) of the BMSC-specific *COX7A1* gene. One-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test was used to evaluate differences between treatments ($*P < 0.05$). Horizontal bars correspond to the median. (c) Analysis of intracellular IGFBP7 in ALL cells after 24 h of culture in medium alone or onto BM stromal layers. Graph represents the mean fluorescence intensity (MFI) of CD19(+) cells labeled for IGFBP7 ($*P < 0.05$; Wilcoxon non-parametric *t*-test). Horizontal bars correspond to the median.

levels in shRNA-IGFBP7-transduced REH and RS4;11 cells (Figure 2a). Downregulation of *IGFBP7* markedly reduced the rate of growth of REH and 697 cells in comparison with shRNA scrambled-transduced cells, but had no apparent effect on RS4;11 cells (Figure 2b). ALL is a heterogeneous disease. Results suggest that the different cell lines may have evolved different growth factor requirements, and that IGFBP7 may potentially exert an autocrine effect on ALL cells.

Paracrine effect of ALL-derived IGFBP7 on BM stromal cells

Since many different cells respond to IGFs and/or insulin, the leukemia-derived IGFBP7 could act in a paracrine manner on BM stromal cells. As shown in Figure 2c, addition of rIGFBP7 to the culture medium had a mitogenic effect on MSCs. However, in the course of this study we found out that BM stromal cells also express the *IGFBP7* gene (Figure 2a). To investigate whether the leukemia-derived IGFBP7 have any impact on BM stromal cells, MSCs were stably transfected with shRNA constructs against *IGFBP7* or a random non-coding sequence. As expected, *IGFBP7* downregulation had a detrimental effect on the rate of growth of MSCs (Figure 2c). Addition of rIGFBP7 to the culture medium rescued the growth rate of *IGFBP7* knockdown MSCs back to normal. Notably, addition of conditioned culture media (1:1) obtained from REH or RS4;11 cells stably transduced with the shRNA scrambled vector fully rescue the growth rate of *IGFBP7* knockdown MSCs, whereas a markedly reduced effect was seen with conditioned culture media of sh.IGFBP7-transduced REH or RS4;11 (Figure 2c). These results suggest that the leukemia-derived IGFBP7 may potentially exert a paracrine effect on BM stromal cells.

IGFBP7 enhances the asparaginase resistance of ALL cells, mainly in a stromal-dependent manner

To determine whether *IGFBP7* could enhance ALL resistance to asparaginase, we cultured different ALL cell lines in medium

supplemented with different combinations of asparaginase (Nalm6–1.0 IU/ml; REH–2.0 IU/ml; 697–3.0 IU/ml and RS4;11–0.001 IU/ml), rIGFBP7 (100 ng/ml) and/or insulin (500 ng/ml). Cells were cultured either alone or onto MSC layers. Importantly, asparaginase was not cytotoxic to BM stromal cells at the dose used (Supplementary Figure 2A). Cell survival/proliferation was evaluated by FACS (Supplementary Figure 3). 'Gates' were designed around the area of the light-scatter dot plot (forward scatter vs side scatter) in which the majority of live leukemic cells were found.³⁰ Absolute counting of viable CD19(+) cells was obtained by using an internal microsphere counting standard. Even though addition of rIGFBP7 plus insulin promoted a slight increase in asparaginase resistance in the absence of MSCs, the effect of IGFBP7:insulin was higher in the presence of MSCs (Figure 3a).

To determine the contribution of the endogenously produced IGFBP7 on ALL resistance to asparaginase, experiments were performed with the *IGFBP7* knockdown cell lines. The number of viable cells was measured by an Annexin V-based assay in conjunction with the microsphere counting standard. As shown in Figure 3b and Supplementary Figure 4, *IGFBP7* downregulation in REH, RS4;11 and 697 cells, and to a lesser extent in the MSCs stromal cells, resulted in decreased resistance of cocultured ALL cells against asparaginase. Notably, resistance could be restored back to a level seen with control cells by the addition of rIGFBP7 to the coculture medium.

These findings were confirmed by performing similar experiments with primary B-precursor ALL cells cultured on MSCs. As shown in Figure 4 and Supplementary Figure 5, addition of rIGFBP7 plus insulin to the culture medium caused a significant increase in ALL survival against asparaginase in five out of six samples analyzed. Compatible results were obtained with coculture assays on primary BMSCs (Supplementary Figure 6) and when rIGFBP7 was used in conjunction with IGF1 or IGF2 (data not shown).

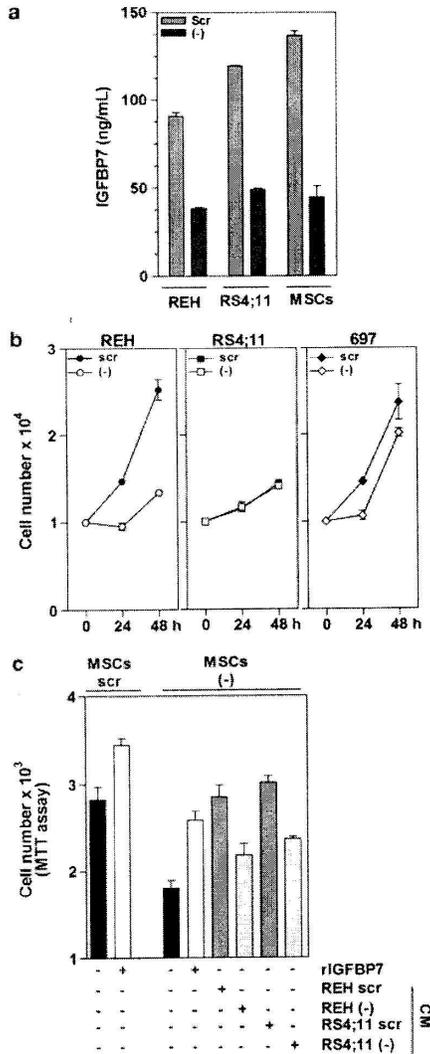


Figure 2. Effect of IGFBP7 on ALL and stromal cell growth. (a) Downregulation of IGFBP7 expression in the conditioned culture media of REH, RS4;11, 697 and MSCs cells stably transduced with lentiviral shRNA constructs against *IGFBP7* or a non-coding random sequence (scrambled). Conditioned media were collected after 24 h of culture in RPMI-10%. IGFBP7 levels were measured by ELISA. Bars represent mean \pm s.e.m. (-), Cells transduced with sh.IGFBP7; scr, cells transduced with sh.Scrambled. Results represent average of triplicates \pm s.e.m. (b) REH, RS4;11 and 697 cells stably transduced with sh.IGFBP7 or sh.Scrambled were cultured in RPMI-10% and expansion was measured at the indicated time points by FACS counting of all viable cells. Points represent mean \pm s.e.m. (c) MSCs stably transduced with sh.IGFBP7 or sh.Scrambled were cultured in RPMI-10% supplemented or not with rIGFBP7 (100 ng/ml) or 1:1 (v:v) conditioned medium (CM) collected after 48 h of culture of ALL cell lines stably transduced with sh.IGFBP7 or sh.Scrambled. Cell survival/proliferation was measured after 72 h of culture by the MTT assay. Absorbance was measured at 590 nm and cell numbers were calculated by comparison with a standard curve. Bars represent mean \pm s.e.m.

Increased IGFBP7 in the malignant BM microenvironment

Since both ALL and stromal cells secrete IGFBP7, both cell types would likely contribute to IGFBP7-mediated asparaginase resistance in the coculture assays. To discriminate whether the major source of IGFBP7 in the coculture assays was ALL or stromal cells, coculture experiments were performed with the IGFBP7 knockdown cell lines, and the levels of extracellular IGFBP7 in the conditioned culture media were measured by ELISA. As shown in Figure 5a and Supplementary Figure 7, extracellular IGFBP7 levels, after 24 h of culture, were more severely affected by *IGFBP7* knockdown in ALL cells (REH and RS4;11) than in the MSCs. Compatible results were obtained when analyzing the conditioned culture media of primary ALL cells on BMSC layers. As shown in Figure 5b, there was a significant correlation between intracellular (median fluorescence intensity of ALL labeled cells) and extracellular IGFBP7 levels. These results seem to indicate that ALL cells, when in high numbers, contribute substantially to IGFBP7 levels in the conditioned media from *in-vitro* coculture experiments. Results would be different if fewer ALL cells were added to the assays. Stromal cells are estimated to represent 2-3% of the total mononuclear cells of the BM.⁴² In the experiments shown in Figure 4, stromal cells were used at a proportion of 3-4%: 100 000 REH/RS4;11 cells were seeded onto ~3000 MSCs, and 200 000 primary ALL were seeded onto ~8000 BMSCs.

Since the leukemic BM is fully dominated by leukemia cells, it is likely that IGFBP7 levels in the leukemic BM would correlate with *IGFBP7* expression by ALL cells. Diagnostic BM plasma samples ($n = 90$) from children with ALL demonstrated significantly higher levels of IGFBP7 than that of control ($n = 16$) subjects (median 49.33 ng/ml vs 30.9 ng/ml, $P = 0.0001$; Figure 5c). The median IGFBP7 level in adult serum was reported to be in the range of 21-35 ng/ml.⁴³ Importantly, the leukemic BM plasma levels of IGFBP7 correlated with *IGFBP7* transcript levels in the corresponding ALL samples ($n = 42$), corrected according to blasts concentration in BM (Figure 5d).

rIGFBP7 stimulates the expression of the *ASNS* gene in BMSCs

Recently, BM mesenchymal cells were shown to express high levels of *ASNS* and to secrete sufficient amounts of asparagine into the culture medium to protect primary ALL cells from asparaginase cytotoxicity.²² We, therefore, investigated if the addition of rIGFBP7 to the culture medium would stimulate the expression of *ASNS* by BMSCs. As shown in Figure 6a, rIGFBP7 induced a clear increase in *ASNS* expression in a time-dependent manner, being maximal (twofold) after 6 h. IGFBP7 is known to act through the binding to different IGFs and chemokines.^{34,35} Some of these soluble factors are known to be secreted by BMSCs,⁴⁴⁻⁴⁶ thus mediating the observed effects of rIGFBP7 addition with no ligand, in serum-free medium.

When rIGFBP7 was added to the culture in conjunction with insulin, an additive *ASNS* upregulation was observed compared with the effect of each factor separately (Figure 6b). Similar effects were observed when IGF1 or IGF2 were substituted for insulin (Supplementary Figure 8).

To address whether higher levels of *ASNS* expression by BMSCs translated into higher levels of asparagine availability to ALL cells, we measured amino-acid levels in the culture supernatants collected from BMSCs after 24 and 48 h of stimulation with rIGFBP7 and/or one of its ligands. Treatment of BMSCs with rIGFBP7 resulted in significantly higher levels of asparagine in comparison with unstimulated cells. Moreover, a strong additive effect on asparagine abundance was observed when rIGFBP7 was used in conjunction with insulin, IGF1 or IGF2 (Figure 6c; Supplementary Table 2).

Prognostic significance of *IGFBP7* expression levels

The expression levels of *IGFBP7* were quantified by RQ-PCR in a series of 181 diagnostic samples from ALL patients treated

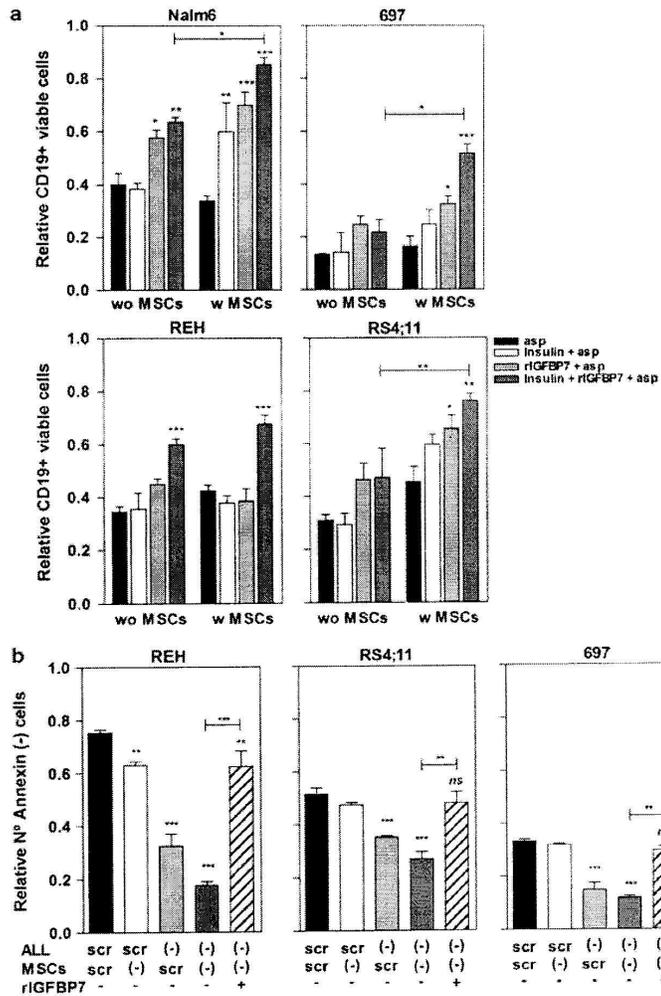


Figure 3. IGFBP7 plus insulin enhance resistance of ALL cell lines to asparaginase. (a) ALL cell lines were cultured alone or onto MSC layers and exposed for 48 h to different combinations of asparaginase: Nalm6 (1 IU/ml); REH (2 IU/ml), RS4:11 (0.001 IU/ml), and 697 (3 IU/ml); rIGFBP7 (100 ng/ml), and insulin (500 ng/ml), in RPMI-10%. Treatments were done in triplicate. Cell survival/proliferation was recorded by FACS counting of viable CD19(+) cells in conjunction with fluorescent beads added for normalization. Representative dot plots are shown in Supplementary Figure 3. Values represent survival/proliferation of each treatment relative to non-treated control. Data shown correspond to mean \pm s.e.m. Statistical analysis were done by two-way ANOVA and Bonferroni post-tests ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$). (b) Asparaginase resistance of ALL cells after *IGFBP7* knockdown in ALL and/or MSCs. Cocultures consisted in different combinations of REH, RS4:11, 697 and MSCs cells stably transduced with sh.*IGFBP7* or sh.Scrambled, in RPMI-10% supplemented with insulin (500 ng/ml). (-), cells transduced with sh.*IGFBP7*; scr, cells transduced with sh.Scrambled. Asparaginase was used at 2, 0.001 and 3 IU/ml for REH, RS4:11 and 697, respectively. When indicated, rIGFBP7 was used at 100 ng/ml. After 48 h, cells were labeled with Annexin V and PI and the absolute number of viable cells was recorded by FACS in conjunction with fluorescent beads added for normalization. Representative dot plots are shown in Supplementary Figure 4. Values represent the absolute number of viable cells for each cell combination, with asparaginase, relative to the same cell combination without asparaginase. Data shown correspond to mean \pm s.e.m. Statistical analysis was done by two-way ANOVA and Bonferroni post-tests for comparisons between scr + scr vs all other cell combinations ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$).

according to the Brazilian GBTLI-99 protocol in a single institution. Any bias in the selection of the 181 samples seems improbable, because the clinicobiological feature distribution and outcome results in this study were similar to the Brazilian GBTLI ALL-99 study conducted during the same period of time (Supplementary Table 3). Normalized *IGFBP7* expression levels ranged from 0.008

to 235.4 (median of 1.42) in ALL samples and from 0.24 to 3.54 (median of 1.36) in mononuclear cells from normal BM samples.

A complete list of patient features and *IGFBP7* expression is given in Table 1. *IGFBP7* mRNA expression levels were lower in children with T-cell immunophenotype ($n = 20$; $P = 0.04$). Associations between *IGFBP7* expression levels and some clinical and

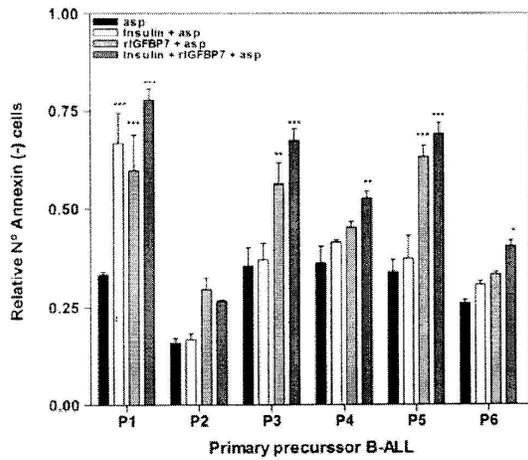


Figure 4. Addition of rIGFBP7 plus insulin to coculture assays enhances primary ALL resistance to asparaginase. ALL cells obtained from six children with ALL (Supplementary Table 1) were cultured onto MSC stromal layers and exposed to asparaginase (0.9 IU/ml) or asparaginase in combinations with rIGFBP7 (100 ng/ml) and/or insulin (500 ng/ml) in AIM-V serum-free medium. After 48 h, cells were labeled with Annexin V and PI and the absolute number of viable cells was recorded by FACS in conjunction with fluorescent beads added for normalization. Representative dot plots are shown in Supplementary Figure 5. Values represent the number of viable cells for each treatment relative to non-treated control. Treatments were done in triplicate. Data shown correspond to mean \pm s.e.m. Differences between asparaginase alone vs asparaginase in combinations with rIGFBP7 and/or insulin were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni post-tests (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

biological variables at diagnosis were investigated in the subgroup of B-precursor ALL. Leukemic blasts from patients with < 1 or ≥ 10 -year old ($n = 40$; $P = 0.008$) or lacking CD10 expression ($n = 7$; $P = 0.007$) had higher *IGFBP7* mRNA expression levels. To investigate the potential influence of *IGFBP7* expression on chemotherapy resistance, LFS was analyzed in a Cox regression model using *IGFBP7* expression (*IGFBP7/ABL*) as a continuous log-transformed variable, so avoiding any arbitrary cutoff point. When all precursor B-cell ALL patients were included in the analysis, patients with higher *IGFBP7* expression (log value) had a tendency to a lower probability of LFS ($P = 0.06$). The Ph chromosome is an independent unfavorable prognostic factor. Accordingly, three out of the five Ph(+) patients of B-phenotype relapsed. All Ph(+) patients had *IGFBP7* expression below the median, thus introducing a potential confounder in the analysis of the clinical impact of *IGFBP7* expression. When Ph(+) patients were excluded from the analysis, patients with higher *IGFBP7* expression levels had significantly lower LFS (hazard ratio for unit increase in \ln *IGFBP7* 1.766, 95% confidence interval 1.208–2.582, $P = 0.003$). Accordingly, the subgroup of patients that had refractory disease or post-remission relapse was significantly associated with higher *IGFBP7* expression levels ($n = 10$; $P = 0.002$; Table 1). To illustrate these findings, patients were divided into quartiles according to *IGFBP7* expression and Kaplan–Meier survival curves were compared by the log-rank test for trend (Figure 7). In multivariate analysis, only risk group and *IGFBP7* expression were significantly and independently associated with LFS ($P = 0.009$ and $P = 0.05$, respectively). The limited number of patients with ELISA-measured *IGFBP7* levels in diagnostic BM plasma precluded any conclusive analysis regarding its association with other clinicobiological variables

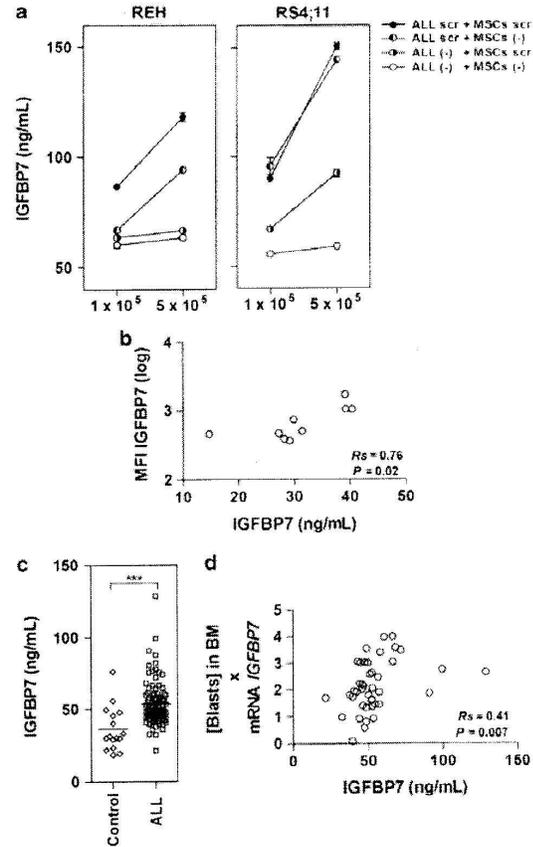


Figure 5. IGFBP7 protein levels in conditioned culture media and diagnostic BM plasma samples from ALL patients and healthy controls. Levels of IGFBP7 protein were measured by ELISA. (a) ALL cells contribute substantially to IGFBP7 levels in conditioned medium collected 24 h after coculture onto MSC layers. Cocultures consisted in different combinations of REH, RS4;11 and MSCs cells stably transduced with sh.IGFBP7 or sh.Scrambled. ALL cells were seeded at 1×10^5 and 5×10^5 cells per 96-well. (–), Cells transduced with sh.IGFBP7; scr, cells transduced with sh.Scrambled. Data shown correspond to mean \pm s.e.m. (b) Correlation between intracellular and extracellular IGFBP7 levels after 24 h coculture of different primary ALL samples onto BMSCs. Median fluorescence intensity (MFI) of anti-IGFBP7-labeled CD19(+) cells was correlated with extracellular IGFBP7 levels as determined by ELISA ($R_s = 0.76$ and $P = 0.02$; Spearman non-parametric test). (c) IGFBP7 protein levels measured in diagnostic BM plasma samples from children with ALL ($n = 90$) or normal healthy age-matched controls ($n = 16$, *** $P < 0.0001$; Mann–Whitney t-test). Bars correspond to the median. (d) Correlation between IGFBP7 protein levels in BM plasma and *IGFBP7* gene expression in the corresponding ALL cells ($n = 42$), corrected according to blasts cell concentrations in BM samples ($R_s = 0.41$ and $P = 0.007$; Spearman non-parametric test).

(data not shown). Together, these data suggest that *IGFBP7* expression may contribute to increased resistance to polychemotherapy in Ph(–) precursor B-cell ALL, even though additional studies in a larger cohort of patients are needed to fully substantiate this finding.

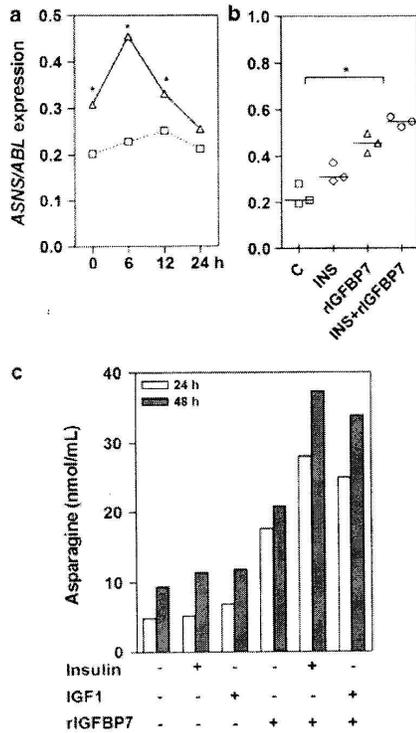


Figure 6. Upregulation of ASNS expression and asparagine concentration in conditioned culture medium from BMSCs upon rIGFBP7 and insulin/IGF stimulation. (a) The expression of ASNS was determined by RQ-PCR in BMSCs at various time points after the addition or not of rIGFBP7 (100 ng/ml) to the culture medium (serum free, containing 1 µg/ml of insulin). Full line represents treatment with rIGFBP7 and dotted line without rIGFBP7. (b) Expression of ASNS mRNA in BMSCs cultured in serum-free medium and stimulated for 6 h with different combinations of 1 µg/ml of insulin (INS) and 100 ng/ml rIGFBP7 or medium alone. Values are for individual replicates. Gene transcript values were normalized with respect to the number of ABL transcripts. Bars correspond to the median (**P* < 0.05; one-way ANOVA Friedman's test). (c) BMSCs were cultured in serum-free, asparagine-free MEM medium supplemented or not with different combinations of rIGFBP7 (100 ng/ml), insulin (500 ng/ml) and IGF1 (200 ng/ml). Amino-acid concentrations were determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography at different time points. A list of all amino acids analyzed is given in Supplementary Table 1, which also includes data obtained with IGF2 (200 ng/ml) ± IGFBP7.

DISCUSSION

Previous studies have shown that leukemia cells establish privileged interactions with BMSCs, resulting in the protection of tumor cells from the cytotoxic effects of chemotherapy.³⁶ The recent definition of a series of genes possibly associated with ALL resistance/sensitivity to chemotherapy²⁴ prompted us to investigate whether some of these genes could be involved in stromal cell regulation of ALL drug resistance. In an initial screening of five genes associated with asparaginase-resistant ALL,²⁴ we found that *IGFBP7* transcript levels were significantly upregulated in primary ALL cells and stromal-independent ALL cell lines upon coculture with BM stromal layers. Similar results were found when *IGFBP7*

Table 1. Associations between *IGFBP7* expression levels and some clinical and biological variables at diagnosis

| Variable | n | All patients | | |
|--|-----|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| | | <i>IGFBP7</i> copy number/ABL copies | | <i>P</i> ^a |
| | | Median | 25 - 75th percentile | |
| Normal BM | 7 | 1.36 | 1.01 - 3.09 | |
| All patients | 181 | 1.42 | 0.27 - 3.89 | 0.40 |
| BCP-ALL | 158 | 1.55 | 0.30 - 3.89 | |
| T-ALL | 20 | 0.4 | 0.11 - 1.68 | 0.04 |
| Precursor B-cell ALL | | | | |
| Gender | | | | |
| F | 72 | 1.47 | 0.31 - 2.83 | |
| M | 86 | 1.60 | 0.29 - 5.00 | 0.26 |
| Age^b (years) | | | | |
| 1 - 9 | 118 | 1.35 | 0.26 - 3.37 | |
| ≥ 10 and < 1 | 40 | 3.04 | 0.64 - 6.54 | 0.008 |
| WBC per µl | | | | |
| < 50 000 | 120 | 1.49 | 0.30 - 3.8 | |
| ≥ 50 000 | 38 | 1.66 | 0.30 - 5.53 | 0.38 |
| DNA index | | | | |
| < 1.16 | 110 | 1.53 | 0.34 - 4.04 | |
| ≥ 1.16 | 21 | 1.76 | 0.36 - 3.37 | 0.99 |
| Chromosomal rearrangement^c | | | | |
| t(12;21) | 40 | 0.97 | 0.30 - 2.85 | |
| Others | 115 | 1.77 | 0.37 - 4.22 | 0.09 |
| Chromosomal rearrangement^c | | | | |
| t(9;22) | 5 | 0.87 | 0.22 - 1.41 | |
| Others | 150 | 1.67 | 0.31 - 4.00 | 0.22 |
| Chromosomal rearrangement^c | | | | |
| t(1;19) | 9 | 0.63 | 0.40 - 1.77 | |
| Others | 146 | 1.60 | 0.29 - 3.94 | 0.45 |
| CALLA antigen | | | | |
| + | 151 | 1.47 | 0.30 - 3.66 | |
| - | 7 | 7.66 | 3.83 - 16.46 | 0.007 |
| Risk^d | | | | |
| HR | 76 | 1.8 | 0.36 - 4.17 | |
| LR | 82 | 1.4 | 0.29 - 3.45 | 0.18 |
| Patients outcome | | | | |
| B-ALL ph(+) | 5 | | | |
| Induction death | 6 | | | |
| Analyzed patients | 147 | | | |
| CR on day 28 | | | | |
| Yes | 141 | 1.55 | 0.30 - 3.89 | |
| No ^e | 6 | 4.87 | 0.30 - 26.51 | 0.12 |
| Post-remission relapse | | | | |
| Yes | 7 | 3.84 | 1.58 - 5.31 | |
| No ^f | 137 | 1.37 | 0.28 - 3.78 | 0.058 |
| Relapse or refractory disease | | | | |
| Yes ^g | 10 | 5.28 | 1.69 - 11.23 | |
| No | 137 | 1.37 | 0.27 - 3.76 | 0.002 |

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; BCP-ALL, B-cell precursor ALL; BM, bone marrow; CR, complete remission; HR, high risk; *IGFBP7*, insulin-like growth factor-binding protein 7; LR, low risk; WBC, white blood cell. ^a*IGFBP7* values were transformed into natural logarithmic values for comparisons. ^bThere were two patients with age below 1 year. ^cAnalysis of each chromosomal rearrangement vs all others (including patients with negative results). Presence of t(9;22), t(12;21), t(1;19) and t(4;11) was determined by RT-PCR. ^dFor risk definition see Scrideli et al.⁵⁷ Mann - Whitney non-parametric *t*-test was used for statistical comparisons. ^eThree out of six patients had refractory disease. Including death in clinical remission. ^fThree out of ten patients had refractory disease.

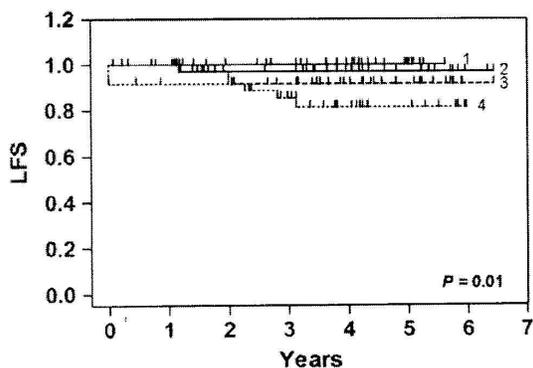


Figure 7. Survival curve for Ph(-) precursor B-cell ALL patients grouped according to *IGFBP7* mRNA expression levels. *IGFBP7* expression was quantified by RQ-PCR in 158 samples of diagnostic precursor-B ALL cells. Gene transcript values were normalized with respect to the number of *ABL* transcripts. Six patients that had induction deaths and five positive for *BCR-ABL* were excluded from analysis. The remaining patients were divided into quartiles according to *IGFBP7* expression levels (first to third quartile had 37 patients each; fourth quartile had 36 patients). LFS denotes period of time from remission date to any relapse. Failure to enter remission due to refractory disease was considered an event at time zero. Patients who died in remission as well as those still alive with no event were censored at last follow-up. Curves were analyzed with the log-rank test for trend.

levels were measured at the protein level both within ALL cells and in conditioned culture media. The ALL-derived IGFBP7 was shown to exert a positive impact on the growth of ALL and stromal cells, in an autocrine and paracrine manner, respectively. More importantly, both ALL-derived IGFBP7 and addition of rIGFBP7 protein to coculture experiments counteracted the effect of asparaginase on ALL survival.

IGFBP7 (*mac25/TAF/AGM*), renamed as *IGFBP-rP1*, is a secreted 30-kDa protein that belongs to a subfamily of low affinity IGFBPs, shown to have different roles in different cellular (tumor) contexts. *IGFBP7* was initially described as an enhancer of the mitogenic activities of IGFs and insulin in fibroblastic cells. Later on, *IGFBP7* has also been ascribed properties of both tumor suppressor and enhancer of cell proliferation.^{47,48} Recent data suggest a stimulatory effect of *IGFBP7* in the adhesion, migration and proliferation of acute myeloid leukemia.⁴⁹ Conversely, *IGFBP7* was found to induce senescence in T-ALL cell lines.⁵⁰ The later results were obtained using *IGFBP7* at concentrations above 5 µg/ml. At these high *IGFBP7* concentrations, we also found an inhibitory effect on the proliferation of B-lineage ALL cell lines (data not shown).

IGFBP7 products function in IGF-dependent or IGF-independent ways to regulate normal and neoplastic cell growth.^{35,51,52} We found that ALL resistance to asparaginase was higher when rIGFBP7 was added in conjunction with insulin. Asparaginase exerts its effects by depleting asparagine (and glutamine) from the serum. Since ALL cells have low intracellular *ASNS* activity, they mostly depend on an extracellular supply of this amino acid and are therefore sensitive to asparagine starvation. Recently, Iwamoto et al.²² demonstrated that *ASNS* expression by BM mesenchymal cells was directly related to increased asparagine secretion into the culture medium and functioned to protect cocultured ALL cells from asparaginase cytotoxicity. Our data extend these findings by suggesting one possible mechanism of bidirectional signaling between ALL cells and BMSCs, where BMSCs stimulate

ALL cell expression of *IGFBP7*, a secreted factor that, in an insulin/IGF-dependent manner, enhances *ASNS* expression and asparagine secretion by BMSCs and thereby counteracts the cytotoxic effects of asparaginase. Accordingly, the ectopic expression of *IGF-1* or *IGF-2* in MCF7 breast cancer cells was reported to upregulate several genes involved in amino-acid transport and biosynthesis, including *ASNS*.⁵³ Although *IGFBP7* stimulation of asparagine production by BMSCs is one likely reason for the observed protection of ALL cells, many other BM stromal factors could also have been regulated by the addition of *IGFBP7* and could account for its effects.

IGFs and insulin increase amino-acid uptake and stimulate protein synthesis in many different cell types. Moreover, IGFs are well-known survival factors, which protect cells from different apoptotic stimuli, including corticoid treatment.^{19,54-56} Evidence exists that ALL cells, both primary cells and cell lines, respond to IGFs or insulin stimulation.³⁶⁻⁴¹ It is, therefore, conceivable that *IGFBP7*, in conjunction with one of its ligands, may have exerted a direct protective effect on ALL cells, either by stimulating asparagine/glutamine synthesis or by inhibiting apoptosis. In preliminary experiments, only a few of our primary ALL samples showed increased resistance to asparaginase when cultured alone in medium with rIGFBP7 plus insulin (three out of nine samples assayed; data not shown). However, the results should be interpreted with caution, because primary ALL cells have a strong tendency to die when cultured in medium alone,¹² therefore, a direct effect of *IGFBP7*:insulin on ALL resistance to asparaginase may have been underestimated. In the case of ALL cell lines, which survive equally well with and without BMSCs, the addition of *IGFBP7* plus insulin resulted in increased resistance against asparaginase even in the absence of stromal cells.

Cultured BMSCs were found to express *IGFBP7* to levels higher (median of 10.15) than most diagnostic samples of ALL cells (median of 1.43), though this may not represent their actual behavior *in vivo*. Therefore, *ASNS* expression by BMSCs is also subjected to autocrine, in addition to paracrine and endocrine, *IGFBP7* regulation. In any case, at a proportion of ~30:1, ALL cells were found to contribute substantially to *IGFBP7* levels in the conditioned coculture medium. Moreover, *IGFBP7* protein levels in diagnostic BM plasma from patients correlated with the levels of *IGFBP7* mRNA in ALL cells, corrected according to blasts concentration in BM, thus suggesting a significant role for leukemic blasts on the levels of this molecule.

In a retrospective analysis of a group of 181 pediatric ALL samples treated in a single institution, higher *IGFBP7* levels (mRNA) were associated with worse LFS of precursor B-cell ALL patients. Although we present evidence of a possible mechanism that may explain *IGFBP7* participation in ALL resistance to asparaginase, the observed impact of *IGFBP7* on LFS seems to suggest a role for this protein, and the IGF/insulin axis, in ALL resistance to other chemotherapeutic agents. Prospective studies in a larger cohort of patients and including the evaluation of IGF and insulin levels are awaited.

In conclusion, our data support a model in which *IGFBP7* is involved in the cross talk between leukemic cells and BMSCs, which may be important in protecting ALL blasts from asparaginase.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from FAPESP 08/10034-1 and CNPq 401122/05 to JAY and FAPESP 05/50731-5 to LGT. ABAL was supported by FAPESP 08/02106-2 and JFV was supported by FAPESP 06/01158-3. We especially acknowledge the contribution of patients and their families.

REFERENCES

- 1 Steinhilber PG, Gaynon PS, Breneman JC, Cherlow JM, Grossman NJ, Kersey JH *et al*. Cytoreduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia—the importance of early marrow response: report from the Childrens Cancer Group. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 389–398.
- 2 Kaspers GJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van wering ER, Van Der Does-Van Den Berg A, Veerman AJ. Prednisolone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: *in vitro-vivo* correlations and cross-resistance to other drugs. *Blood* 1998; **92**: 259–266.
- 3 Schmiegelow K, Nyvold C, Seyfarth J, Pieters R, Rottier MM, Knabe N *et al*. Post-induction residual leukemia in childhood acute lymphoblastic leukemia quantified by PCR correlates with *in vitro* prednisolone resistance. *Leukemia* 2001; **15**: 1066–1071.
- 4 Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH *et al*. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; **105**: 4752–4758.
- 5 Pieters R, Kaspers GJL, van Wering ER, Huisman DR, Loonen AH, Hählen K *et al*. Cellular drug resistance profiles that might explain the prognostic value of immunophenotype and age in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1993; **7**: 392–397.
- 6 Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Hoelzer D, Slater RM, den Boer ML, Loonen AH *et al*. *In vitro* drug resistance profile of Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia is heterogeneous and related to age: a report of the Dutch and German Leukemia study Groups. *Med Pediatr Oncol* 2002; **38**: 379–386.
- 7 Aricó M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A *et al*. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **342**: 998–1006.
- 8 Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W *et al*. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002; **359**: 1909–1915.
- 9 Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Beverloo HB *et al*. TEL/AML1 gene fusion is related to *in vitro* drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; **96**: 1094–1099.
- 10 Whitehead VM, Payment C, Cooley L, Lauer SJ, Mahoney DH, Shuster JJ *et al*. The association of the TEL-AML1 chromosomal translocation with the accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts and with ploidy in childhood B-progenitor cells acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 2001; **15**: 1081–1088.
- 11 Murti KG, Brown PS, Kumagai M, Campana D. Molecular interactions between human B-cell progenitors and the bone marrow microenvironment. *Exp Cell Res* 1996; **226**: 47–58.
- 12 Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992; **79**: 2370–2377.
- 13 Manabe A, Murti KG, Coustan-Smith E, Kumagai M, Behm FG, Raimondi SC *et al*. Adhesion dependent survival of normal and leukemic human B lymphoblasts on bone marrow stromal cells. *Blood* 1994; **83**: 758–766.
- 14 Bradstock K, Makrynikola V, Bianchi A, Byth K. Analysis of the mechanism of adhesion of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells to bone marrow fibroblasts. *Blood* 1993; **82**: 3437–3444.
- 15 Wu S, Korte A, Keibelmann-Betzinger C, Gessner R, Henze G, Seeger K. Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression. *Leuk Res* 2005; **29**: 63–72.
- 16 Veiga JP, Costa LF, Sallana SE, Nadler LM, Cardoso AA. Leukemia-stimulated bone marrow endothelium promotes leukemia cell survival. *Exp Hematol* 2006; **34**: 610–621.
- 17 Mudry RE, Fortney JE, York T, Hall BM, Gibson LF. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 2000; **96**: 1926–1932.
- 18 Fortney JE, Zhao W, Wenger SL, Gibson LF. Bone marrow stromal cells regulate caspase 3 activity in leukemic cells during chemotherapy. *Leuk Res* 2001; **25**: 901–907.
- 19 Pifer J, Stephan RP, Lill-Elghanian DA, Le PT, Witte PL. Role of stromal cells and their products in protecting young and aged B-lineage precursors from dexamethasone-induced apoptosis. *Mech Ageing Dev* 2003; **124**: 207–218.
- 20 Hall BM, Fortney JE, Taylor L, Wood H, Wang L, Adams S *et al*. Stromal cells expressing elevated VCAM-1 enhance survival of B lineage tumor cells. *Cancer Lett* 2004; **207**: 229–239.
- 21 Wang L, Fortney JE, Gibson LF. Stromal cell protection of B-lineage acute lymphoblastic leukemic cells during chemotherapy requires active Akt. *Leuk Res* 2004; **28**: 733–742.
- 22 Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1049–1057.
- 23 Wang L, Chen L, Benincosa J, Fortney J, Gibson LF. VEGF-induced phosphorylation of Bcl-2 influences B lineage leukemic cell response to apoptotic stimuli. *Leukemia* 2005; **19**: 344–353.
- 24 Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM *et al*. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 2004; **351**: 533–542.
- 25 Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, Matsuda EI, Otubo R, Yunes JA *et al*. 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 (GBTL) Protocol ALL-99. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 1911–1918.
- 26 Mihara K, Imai C, Coustan-Smith E, Dome JS, Dominici M, Vanin E *et al*. Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *Br J Haematol* 2003; **120**: 846–849.
- 27 Watzinger F, Lion T. Multiplex PCR for quality control of template RNA/cDNA in RT-PCR assays. *Leukemia* 1998; **12**: 1984–1986.
- 28 Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E *et al*. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; **17**: 2474–2486.
- 29 Puatti M, Sodek L. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. *Plant Physiol Biochem* 1999; **37**: 767–773.
- 30 Swat W, Ignatowicz L, Kisielow P. Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; **137**: 79–87.
- 31 Kusukake M, Ishihara R, Momose K, Isaka K, Itokazu O, Higuma C *et al*. Circulating IGF-binding protein 7 (IGFBP7) levels are elevated in patients with endometriosis or undergoing diabetic hemodialysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; **6**: 54.
- 32 Akaogi K, Okabe Y, Funahashi K, Yoshitake Y, Nishikawa K, Yasumitsu H *et al*. Cell adhesion activity of a 30-kDa major secreted protein from human bladder carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **198**: 1046–1053.
- 33 Sato J, Hasegawa S, Akaogi K, Yasumitsu H, Yamada S, Sugahara K *et al*. Identification of cell-binding site of angiomodulin (AGM/TAF/Mac25) that interacts with heparan sulfates on cell surface. *J Cell Biochem* 1999; **75**: 187–195.
- 34 Nagakubo D, Murai T, Tanaka T, Usui T, Matsumoto M, Sekiguchi K *et al*. A high endothelial venule secretory protein, mac25/angiomodulin, interacts with multiple high endothelial venule-associated molecules including chemokines. *J Immunol* 2003; **171**: 553–561.
- 35 Akaogi K, Sato J, Okabe Y, Sakamoto Y, Yasumitsu H, Miyazaki K. Synergistic growth stimulation of mouse fibroblasts by tumor-derived adhesion factor with insulin-like growth factors and insulin. *Cell Growth Differ* 1996; **7**: 1671–1677.
- 36 Gibson LF. Survival of B lineage leukemic cells: signals from the bone marrow microenvironment. *Leuk Lymphoma* 2002; **43**: 19–27.
- 37 Pieters R, Loonen AH, Huisman DR, Broekema GJ, Driven MW, Heyenbroek MW *et al*. *In vitro* drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood* 1990; **76**: 2327–2336.
- 38 Estrov Z, Meir R, Barak Y, Zaizov R, Zadik Z. Human growth hormone and insulin-like growth factor-1 enhance the proliferation of human leukemic blasts. *J Clin Oncol* 1991; **9**: 394–399.
- 39 Baier TG, Ludwig WD, Schönberg D, Hartmann KK. Characterisation of insulin-like growth factor I receptors of human acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cell lines and primary ALL cells. *Eur J Cancer* 1992; **28A**: 1105–1110.
- 40 Baier TG, Jenne EW, Blum W, Schönberg D, Hartmann KK. Influence of antibodies against IGF-I, insulin or their receptors on proliferation of human acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leuk Res* 1992; **16**: 807–814.
- 41 Neely EK, Rosenfeld RG, Illescas A, Smith SD. Mitogenic effects of human recombinant insulin on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 1992; **6**: 1134–1142.
- 42 Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 2000; **185**: 98–106.
- 43 López-Bermejo A, Khosravi J, Corless CL, Krishna RG, Diamandi A, Bodani U *et al*. Generation of anti-insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1(IGFBP-rP1/MAC25) monoclonal antibodies and immunoassay: quantification of IGFBP-rP1 in human serum and distribution in human fluids and tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 3401–3408.
- 44 Cheng SL, Zhang SF, Mohan S, Lecanda F, Fausto A, Hunt AH *et al*. Regulation of insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in human bone marrow stromal cells by dexamethasone. *J Cell Biochem* 1998; **71**: 449–458.
- 45 Honczarenko M, Lê Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 2006; **24**: 1030–1041.

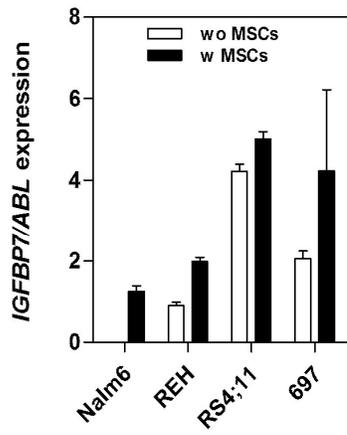
- 46 Hokari M, Kuroda S, Shichinohe H, Yano S, Hida K, Iwasaki Y. Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *J Neurosci Res* 2008; **86**: 1024-1035.
- 47 Jiang W, Xiang C, Cazacu S, Brodie C, Mikkelsen T. Insulin-like growth factor binding protein 7 mediates glioma cell growth and migration. *Neoplasia* 2008; **10**: 1335-1342.
- 48 Georges RB, Adwan H, Hamdi H, Hielscher T, Linnemann U, Berger MR. The insulin-like growth factor binding proteins 3 and 7 are associated with colorectal cancer and liver metastasis. *Cancer Biol Ther* 2011; **12**: 69-79.
- 49 Hu S, Chen R, Man X, Feng X, Cen J, Gu W et al. Function and expression of insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7) gene in childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2011; **28**: 279-287.
- 50 Heesch S, Schlee C, Neumann M, Stroux A, Kuhn A, Schwartz S et al. BAALC-associated gene expression profiles define IGFBP7 as a novel molecular marker in acute leukemia. *Leukemia* 2010; **24**: 1429-1436.
- 51 Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim HS, Wilson E, Rosenfeld RG. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and IGF-II. *J Biol Chem* 1996; **271**: 30322-30325.
- 52 Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts Jr CT, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 12981-12986.
- 53 Pacher M, Seewald MJ, Mikula M, Oehler S, Mogg M, Vinatzer U et al. Impact of constitutive IGF1/IGF2 stimulation on the transcriptional program of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2007; **28**: 49-59.
- 54 Tu W, Cheung PT, Lau YL. Insulin-like growth factor 1 promotes cord blood T cell maturation and inhibits its spontaneous and phytohemagglutinin-induced apoptosis through different mechanisms. *J Immunol* 2000; **165**: 1331-1336.
- 55 Ogawa M, Nishiura T, Oritani K, Yoshida H, Yoshimura M, Okajima Y et al. Cytokines prevent dexamethasone-induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line. *Cancer Res* 2000; **60**: 4262-4269.
- 56 Leverrier Y, Thomas J, Mathieu AL, Low W, Blanquier B, Marvel J. Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 290-296.
- 57 Scrideli CA, Assumpção JG, Ganazza MA, Araújo M, Toledo SR, Lee ML et al. 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* 2009; **94**: 781-789.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

Figura Suplementar 1

Supplementary figure 1

A



B

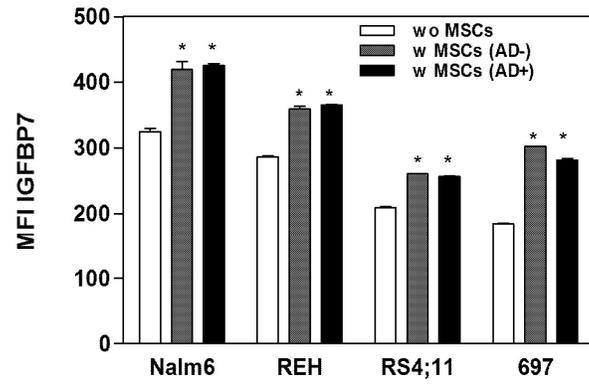
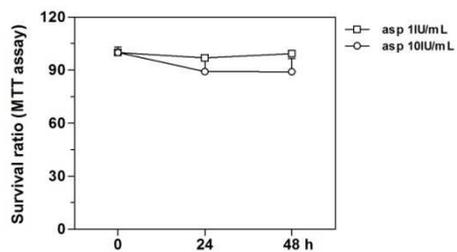


Figura Suplementar 2

Supplementary figure 2

A



B

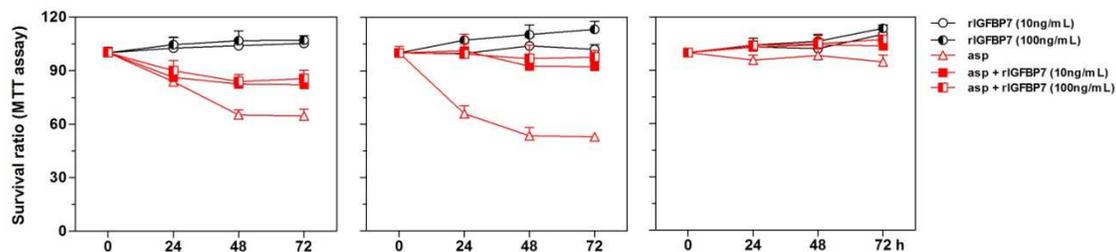


Figura Suplementar 3

Supplementary figure 3

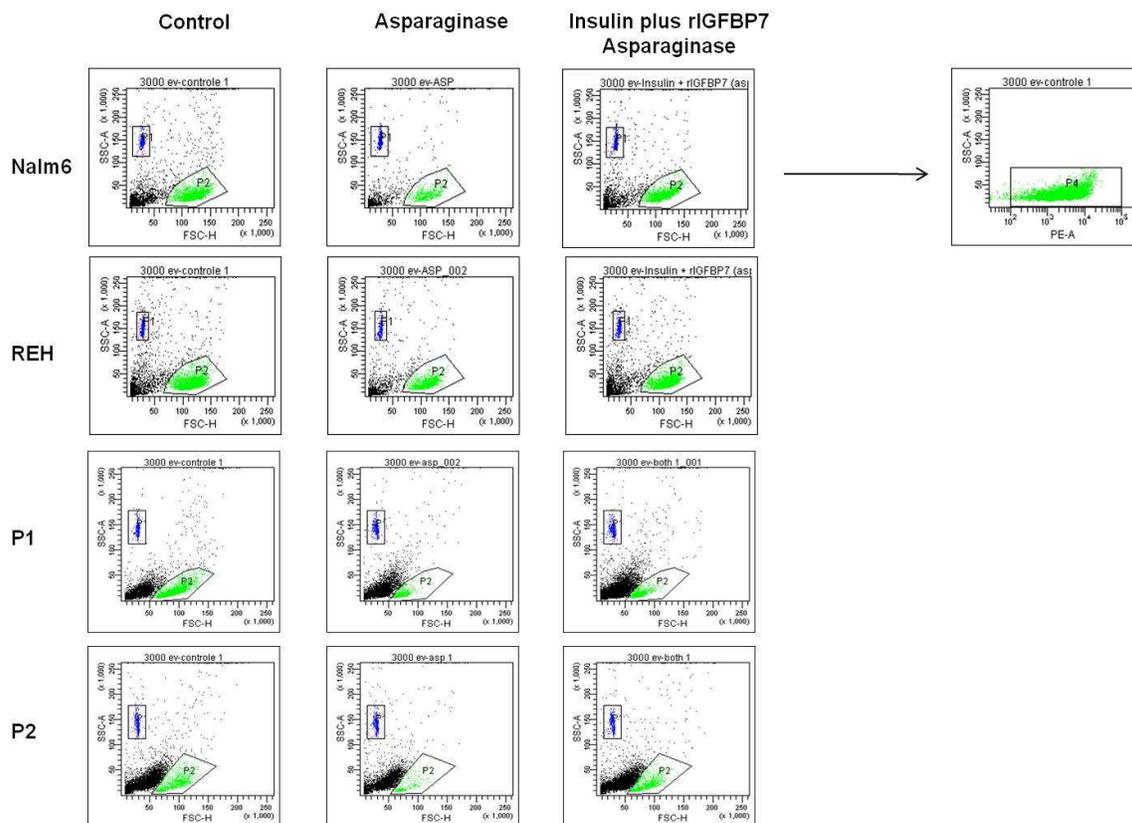
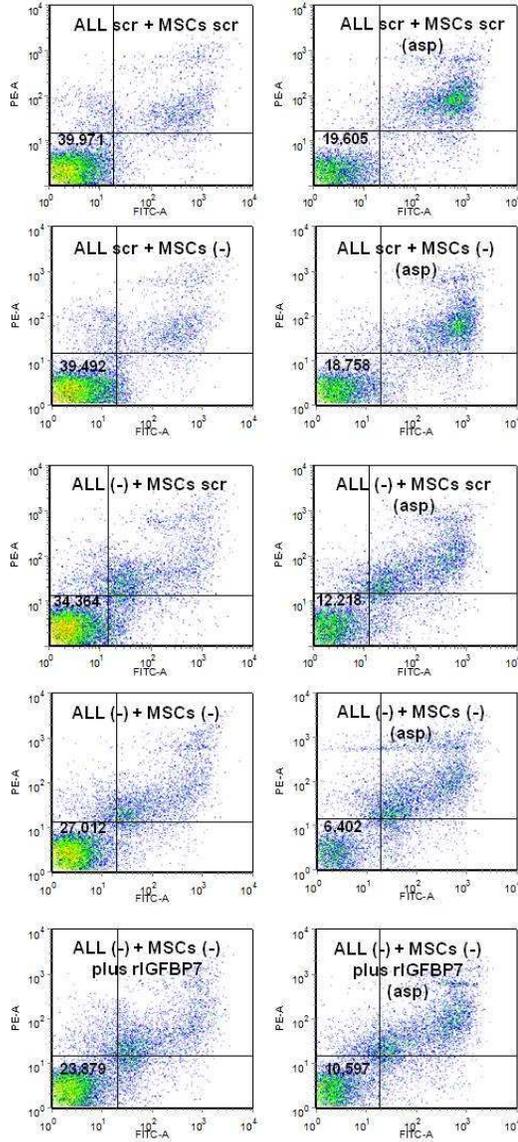


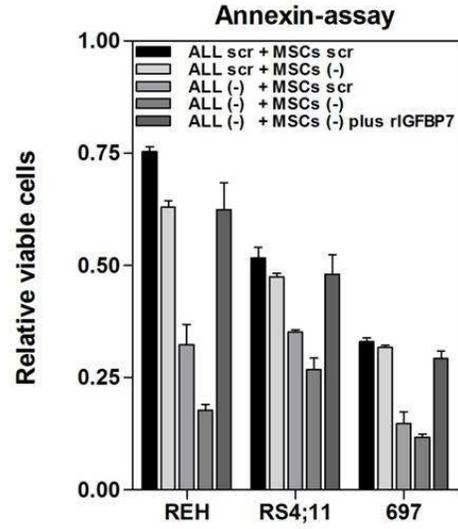
Figura Suplementar 4

Supplementary figure 4

A



B



C

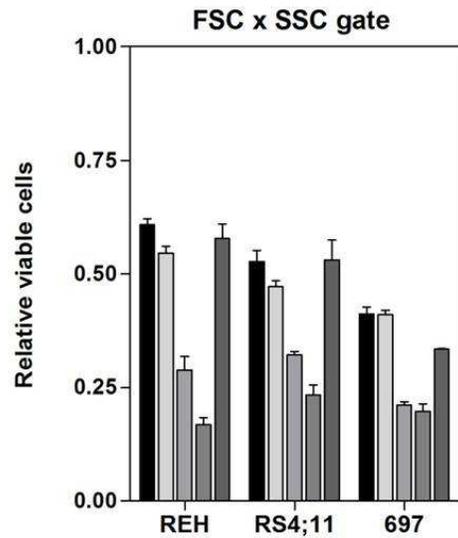


Figura Suplementar 5

Supplementary figure 5

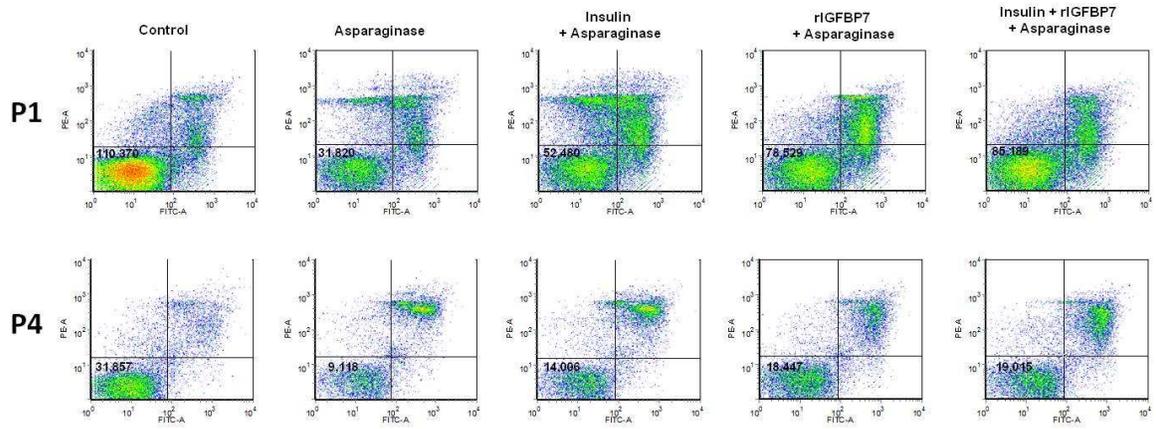
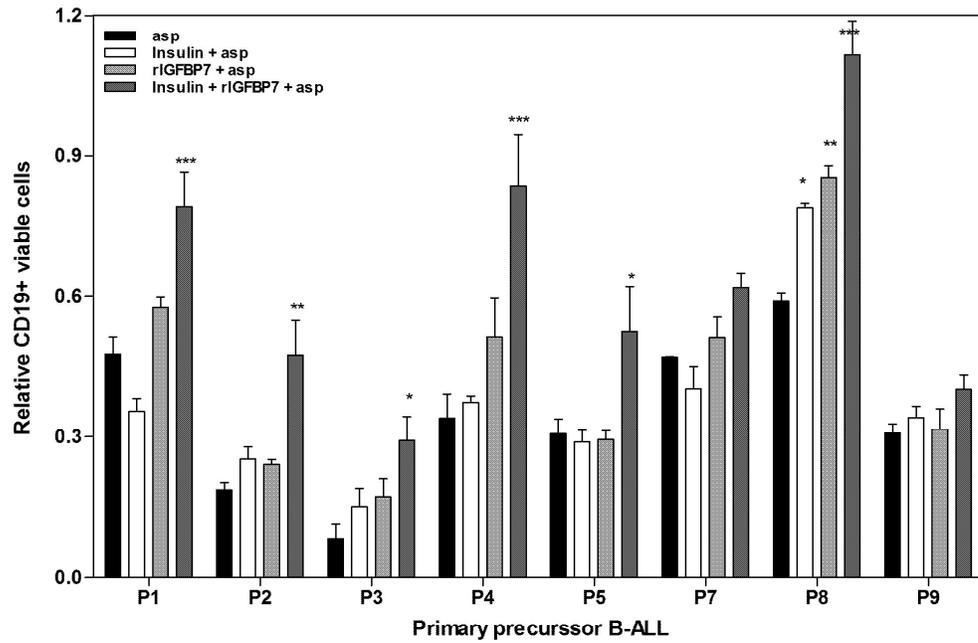


Figura Suplementar 6

Supplementary figure 6

A



B

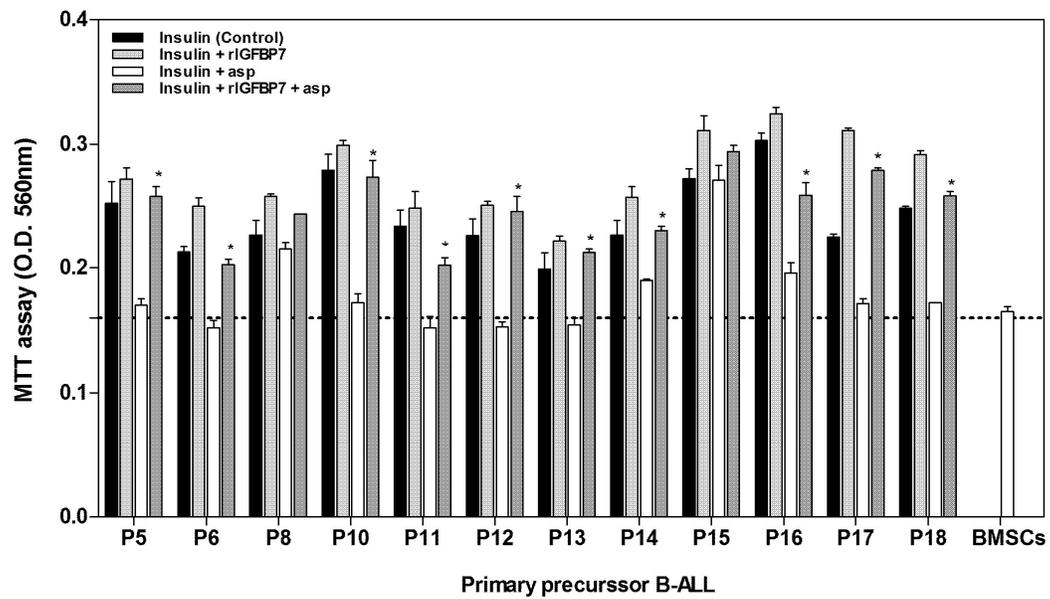


Figura Suplementar 7

Supplementary figure 7

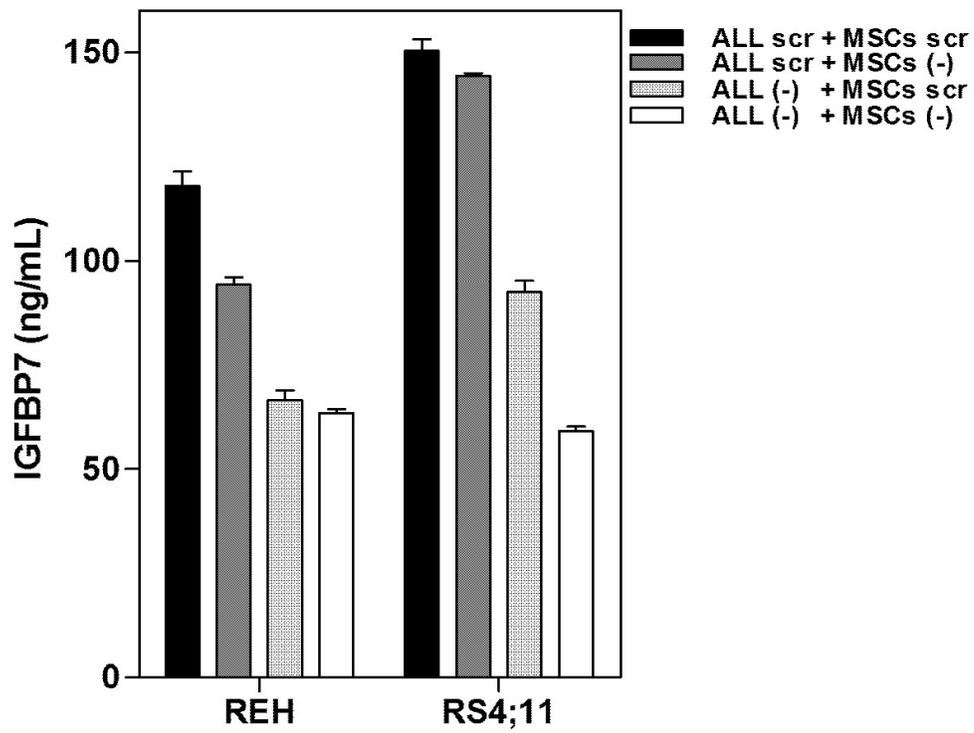
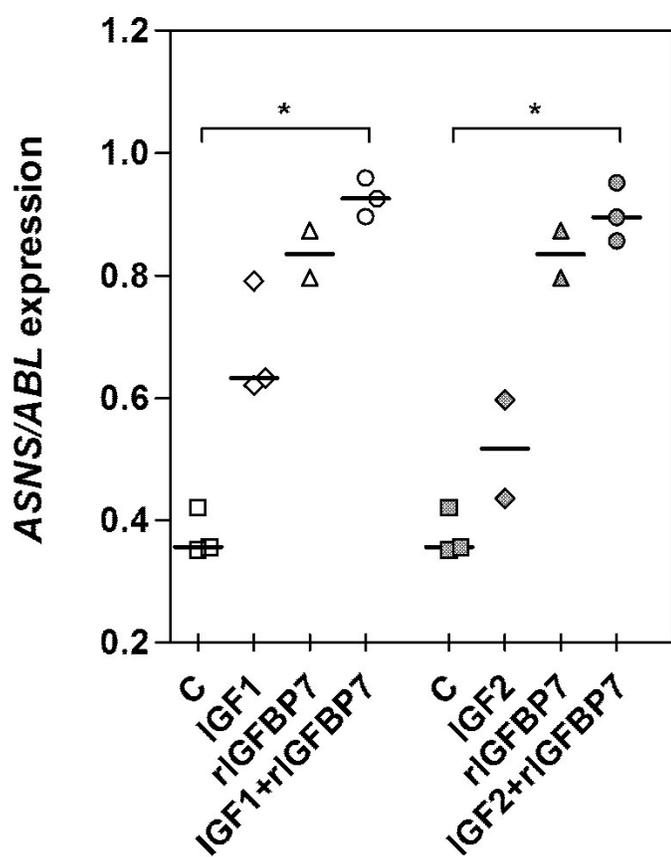


Figura Suplementar 8

Supplementary figure 8



Supplementary Figures Legends

Supplementary Figure 1. Upregulation of *IGFBP7* transcripts and protein levels in leukemia cell lines upon coculture with hTERT-MSCs. (A) ALL cell lines were cultured with or without MSCs for 6 h. *IGFBP7* expression levels were determined by RQ-PCR. *IGFBP7* levels were normalized with respect to the number of *ABL* transcripts. Data shown correspond to mean \pm SEM. (B) Analysis of intracellular IGFBP7 in ALL cell lines after 24 h of culture in medium alone or in conjunction with MSCs. Different wash stringencies were used to discriminate free and weakly adherent ALL cells (AD-) from the tightly adherent ones (AD+) (* $P < 0.001$; 2way ANOVA and Bonferroni posttest). Data shown correspond to mean \pm SEM.

Supplementary Figure 2. Effect of asparaginase on BMSCs and cocultured primary B-precursor ALL. (A) BMSCs are resistant to asparaginase. Subconfluent BMSCs were cultured with 1 and 10 IU/ml of asparaginase. Cell survival/proliferation was measured by the MTT assay at different time points. (B) rIGFBP7 promotes resistance of precursor B-ALL cells against asparaginase. Primary precursor B-ALL cells were cultured onto BMSCs layers in serum free AIM-V medium (Gibco BRL) supplemented with recombinant human insulin (5 μ g/ml, BioBras) and antibiotics. Cells were treated with asparaginase 0.9 IU/ml and/or IGFBP7 (10 or 100 ng/ml). Graphs represent 3 representative cases. Cell survival/proliferation was measured by the MTT assay. For MTT reduction by BMSCs see legend to Supplementary Figure 6. Since, our BM stromal cells seemed to be resistant to asparaginase levels up to 10 IU/ml, the effects of asparaginase treatment most likely represent differences in ALL cell survival/proliferation. However, this may not be true for

the effects seen with IGFBP7-insulin alone (without asparaginase), because IGFBP7-insulin were shown to exert a positive effect on both ALL and BMSCs.

Supplementary Figure 3. Representative FSC vs SSC dot plots showing gates used for counting viable CD19+ ALL cells and fluorescent beads. ALL cells were cultured onto BM stromal cell layers. Green, area of the light scatter dot plot (FSC vs SSC) in which the majority of live leukemic cells were found; Blue, area where 3,000 beads events were counted for normalization.

Supplementary Figure 4. Validity of light scatter FACS dot plot gates for the quantitation of cell survival/proliferation. ALL cell lines were cultured onto MSCs layers as indicated in the legend to Figure 3B. (A) The absolute number of viable cells was determined after Annexin-V- Alexa Fluor 488 and propidium iodide staining. Representative dot plots for RS4;11 are presented. The absolute number of Annexin-V-negative cells per 3,000 beads events was recorded in the respective quadrant. Cell survival/proliferation was recorded as the number of viable cells for each asparaginase-treated cell combination relative to the same cell combination without asparaginase. (B) Bar graph corresponding to the annexin-V/PI labeling experiment. (C) Results from the same experiment, but absolute number of viable cells was recorded by a FSC vs SSC gate designed around the area in which the majority of live leukemic cells were found (see Supplementary Figure 3). Cell survival/proliferation was recorded as above.

Supplementary Figure 5. Representative Annexin V / PI dot plots for the bar graph shown in Figure 4. Primary ALL cells were cultured onto MSCs layers as indicated in the legend to Figure 4. The absolute number of viable cells was determined after Annexin-V-Alexa Fluor 488 and propidium iodide staining. Representative dot plots for two patients are presented. The absolute number of Annexin-V-negative cells per 3,000 beads events was

recorded in the respective quadrant. Cell survival/proliferation was recorded as the number of viable cells for each of the different asparaginase treatments relative to control (without asparaginase).

Supplementary Figure 6. Addition of rIGFBP7 plus insulin to coculture assays enhances ALL resistance to asparaginase. Primary ALL cells obtained from children with ALL (Supplementary Table 1) were cultured on BM stromal layers and exposed to different combinations of asparaginase (0.9 IU/ml), rIGFBP7 (100 ng/ml), and insulin (500 ng/ml) in AIM-V serum-free medium. (A) Number of viable cells were recorded after 48 h of coculture by FACS counting of viable CD19(+) cells in conjunction with fluorescent beads added for normalization. Representative FACS dot plots are presented in Supplementary Figure 3. Values represent the cell survival/proliferation of each treatment relative to non-treated control. Treatments were done in triplicate. Data shown correspond to mean \pm SEM. Differences between asparaginase alone *versus* asparaginase in combinations with rIGFBP7 and/or insulin were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni posttests (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001). (B) Metacellular cell survival/proliferation after 72 h was evaluated by the MTT assay. The contribution of BMSCs to the reduction of the tetrazolium salt was evaluated in separate wells (BMSCs) in order to better appreciate the contribution of ALL cells. Please see legend to Supplementary Figure 2. Values are relative to the control (cells cocultured in AIM-V medium without asparaginase). Treatments were done in duplicates. Data shown correspond to mean \pm SEM (* P <0.05; 2way ANOVA and Bonferroni posttests were used to evaluate individual samples responses related to asparaginase treatment). Since, our BM stromal cells seemed to be resistant to asparaginase levels up to 10 IU/ml, the effects of asparaginase treatment on OD values of coculture assays most likely represent differences in ALL cell survival/proliferation.

Supplementary Figure 7. ALL cell lines contribute substantially to IGFBP7 levels in conditioned coculture medium. This is the same experiment shown in Figure 5A, but IGFBP7 levels (of 5×10^5 cocultured ALL cells) are shown as bars. Data shown correspond to mean \pm SEM.

Supplementary Figure 8. Upregulation of *ASNS* expression in BMSCs upon rIGFBP7 stimulation. Expression of *ASNS* mRNA in BMSCs cultured in serum-free medium and stimulated for 6 h with different combinations of 200 ng/ml of IGF1, 200 ng/ml of IGF2, and 100 ng/ml rIGFBP7 or medium alone. Values are for individual replicates. C, untreated control. Gene transcript values were normalized with respect to the number of *ABL* transcripts. Bars correspond to the median ($*P < 0.05$; 1way ANOVA and Friedman posttest).

Supplementary Table 1. Clinical and biological features of precursor B-ALL samples used in functional studies.

| | Gender | Age | Chromosome translocation¹ | WBC per μL | CALLA | DNA index |
|------------|---------------|------------|---|----------------------------------|--------------|------------------|
| P1 | M | 9.21 | t(9;22) p190 | 134,000 | 1 | 1 |
| P2 | M | 3.22 | negative | 38,900 | 1 | 1 |
| P3 | F | 5.39 | negative | 60,990 | 1 | 1 |
| P4 | F | 10.25 | negative | 45,000 | 1 | 1 |
| P5 | M | 16.39 | t(9;22) p190 | 354,000 | 1 | 1 |
| P6 | F | 3.69 | negative | 7,200 | 1 | 1 |
| P7 | M | 11.21 | negative | 188,000 | 1 | 1 |
| P8 | M | 3.28 | negative | 44,400 | 1 | 1 |
| P9 | F | 5.33 | negative | 35,600 | 1 | 1 |
| P10 | F | 4.98 | negative | 30,200 | 1 | 1 |
| P11 | F | 16.87 | negative | 148,500 | 1 | 1 |
| P12 | M | 2.23 | negative | 77,000 | 1 | 1 |
| P13 | M | 8.61 | negative | 8,500 | 1 | 1 |
| P14 | F | 2.89 | negative | 210,000 | 1 | 1 |
| P15 | M | 12.11 | negative | 32,200 | 1 | 1 |
| P16 | M | 5.37 | negative | 143,000 | 1 | 1 |
| P17 | M | 5.38 | negative | 7,500 | 1 | 1 |
| P18 | F | 2.84 | negative | 64,700 | 1 | 1 |

¹ t(9;22), t(4;11), t(1;19), t(12;21) as determined by RT-PCR of the fusion transcripts *BCR-ABL* p190, *BCR-ABL* p210, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1*, *TEL-AML1*
CALLA (1) – correspond CD10(+) blasts; and DNA index (1) – correspond < 1.16.

Supplementary Table 2. Amino acids concentrations in conditioning culture media of BMSCs at different time points.

| | 0h | Control | | IGFBP7 | | Insulin | | Insulin + IGFBP7 | | IGF1 | | IGF1 + IGFBP7 | | IGF2 | | IGF2 + IGFBP7 | |
|------------|-------|---------|-------|--------|--------|---------|--------|------------------|--------|--------|-------|---------------|--------|--------|-------|---------------|--------|
| | | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| Asp | 104.6 | 105.6 | 100.8 | 113.9 | 96.9 | 87.3 | 105.3 | 107.5 | 98.9 | 110.9 | 106.5 | 109.7 | 113.4 | 110 | 104.1 | 116.5 | 115.1 |
| Glu | 102.2 | 125.5 | 131.7 | 128.3 | 136 | 112.7 | 132.3 | 118.9 | 135.4 | 127.1 | 152.6 | 124 | 151.3 | 132 | 144 | 129.8 | 145.3 |
| Asn | 0 | 4.9 | 9.4 | 17.6 | 20.8 | 5.2 | 11.4 | 28 | 37.4 | 6.9 | 11.8 | 25 | 33.9 | 6.4 | 10.6 | 23.4 | 31.7 |
| Ser | 117.7 | 114.9 | 136.1 | 134.5 | 112.1 | 106.9 | 116.9 | 118.1 | 121.7 | 142.3 | 115.4 | 131.9 | 136.6 | 118 | 105.6 | 135.8 | 141.1 |
| Gln | 1853 | 1860.2 | 799.5 | 1985.1 | 1737.6 | 1850.5 | 1749.4 | 1883.6 | 1761.8 | 1630.5 | 1623 | 1687.4 | 1707.7 | 1705.6 | 1510 | 1793.6 | 1663.5 |
| His | 208.6 | 212 | 235 | 226.9 | 211.3 | 224.9 | 228.9 | 218.1 | 171.4 | 212.9 | 223.1 | 205.1 | 210.2 | 222.1 | 196.2 | 221.1 | 214.1 |
| Gly | 117.3 | 119.5 | 114.5 | 124.1 | 122.7 | 118.2 | 115.9 | 112.7 | 114.1 | 107.2 | 102.7 | 104.8 | 112.6 | 113 | 109.4 | 108.5 | 110.3 |
| Thr | 408.7 | 417.1 | 99.2 | 432.9 | 428.6 | 411.5 | 404.8 | 393.7 | 398.8 | 429.4 | 411.2 | 419.1 | 425.1 | 425.3 | 417.7 | 415.4 | 421.3 |
| Arg | 623.1 | 670.1 | 662.9 | 707.2 | 688.6 | 637.6 | 652.5 | 661.1 | 698.6 | 552.4 | 575.6 | 596.8 | 651.9 | 572.7 | 542.9 | 616 | 607.5 |
| Ala | 101.7 | 110.9 | 120.5 | 115 | 121.9 | 109.5 | 128.3 | 94.8 | 122.8 | 112.3 | 135.6 | 98.6 | 128.4 | 109.9 | 123.4 | 99 | 127 |
| Tyr | 287.3 | 296.6 | 285.4 | 316.9 | 298.1 | 307.1 | 300.1 | 292.1 | 299.7 | 224.2 | 246.5 | 222 | 241 | 237.7 | 240 | 232 | 229.4 |
| Met | 90.2 | 94.5 | 101.9 | 106.9 | 96.4 | 99.9 | 108.1 | 95.2 | 98.4 | 69.2 | 79.8 | 75.5 | 84 | 76.8 | 79.5 | 80.1 | 80.1 |
| Val | 419 | 425.7 | 397.2 | 458.3 | 413.7 | 440.6 | 392.4 | 402.6 | 406 | 355.9 | 374.2 | 337.6 | 379.3 | 372.5 | 366.9 | 367.2 | 357.9 |
| Phe | 211.2 | 217 | 208.8 | 236.9 | 211.9 | 226.3 | 218.1 | 213.6 | 211.2 | 180.3 | 197.3 | 173.4 | 196.7 | 191.7 | 193.5 | 187.8 | 183 |
| Ile | 388.3 | 385.4 | 393.1 | 435 | 387.3 | 392.8 | 395.3 | 408.2 | 390.2 | 305.4 | 326.1 | 328.6 | 345.8 | 332.3 | 323.6 | 343.2 | 335.1 |
| Leu | 398.8 | 384.6 | 397.3 | 446 | 395 | 400.8 | 402.7 | 408.8 | 393.8 | 328.5 | 357.8 | 337.8 | 362.6 | 353.4 | 319.5 | 371.2 | 355 |
| Lys | 402.4 | 451.3 | 397.8 | 296.8 | 481.9 | 472.8 | 497.2 | 480.4 | 481.9 | 286.2 | 275.1 | 295.6 | 279.5 | 324.2 | 256.1 | 270.3 | 210.4 |

BMSCs were cultured in MEM medium without asparagine. Values are in nmol/ml.

Supplementary Table 3. Demographic characteristics for the group of ALL patients included in the *IGFBP7* mRNA expression analysis *versus* all consecutive ALL patients treated on the GBTLI ALL-99 protocol in our institution.

| | Group 1 (this paper) N (%) | Group 2 (GBTLI ALL-99) ¹ N (%) |
|--|--|---|
| N° of patients included | 181 | 383 |
| Age at diagnosis. years | | |
| 1-9 years | 131 (73.5) | 278 (72.6) |
| ≥ 10 and < 1 year | 50 (26.5) | 96 (27.4) |
| Gender | | |
| Male | 103 (56.9) | 221 (57.7) |
| Female | 78 (43.1) | 163 (42.3) |
| WBC count at diagnosis (x10³/μl) | | |
| < 50.000 | 128 (70.7) | 270 (70.4) |
| ≥ 50.000 | 53 (29.3) | 113 (29.6) |
| Immunophenotyping | | |
| T cell derived | 20 (11.0) | 56 (14.6) |
| B-derived | 158 (87.3) | 320 (85.4) |
| CD10 positive | 156 (86.2) | 321 (83.8) |
| CD10 negative | 22 (12.2) | 54 (16.2) |
| DNA index | | |
| < 1.16 | 122 (67.4) | 277 (72.3) |
| ≥ 1.16 | 21 (11.6) | 45 (27.7) |
| Molecular Biology tests | | |
| Negative | 116 (64.1) | 219 (57.1) |
| t(9;22) | 6 (3.3) | 8 (2.0) |
| t(4;11) | 3 (1.7) | 3 (0.8) |
| t(1;19) | 9 (5.0) | 17 (4.4) |
| t(12;21) | 40 (22.1) | 69 (18.0) |
| Risk | | |
| Low risk | 87 (48.0) | 181 (47.2) |
| High risk | 95 (52.3) | 202 (52.8) |
| Remission | | |
| yes | 167 (92.2) | 337 (87.9) |
| No | 14 (7.8) | 46 (12.1) |

¹ Group of all consecutive ALL patients admitted to treatment at the Centro Infantil Boldrini according to the GBTLI ALL-99 protocol.²⁵ Abbreviations: GBTLI ALL, Brazilian childhood cooperative group for ALL treatment; ALL, acute lymphoblastic leukemia; Pts, patients; N, number; and WBC, white blood cell count.

Supplementary Materials and Methods

Primers and protocol for gene expression analysis. Primers were designed with Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) or Primer Premier 5 (Premier Biosoft International) softwares. Care was taken to place forward and reverse primers in different exons and in regions with no alternative splicing and polymorphisms. Primers were as follows: *ABL*, 5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3' and 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3';²⁸ *GRP56*, 5'-TCAGCCAGTTCCTGAAGCAT-3' and 5'-CTCCTCGAAGGACACCATGT-3'; *MAN1A1*, 5'-GGCCCAACACTACCTTGAAC-3' and 5'-TGTAGCGATGGCTTCAACAC-3'; *SCGF*, 5'-TTGGAGGGCTGCCTGAAG-3' and 5'-CGAGAGCAGGAAGCACTTGT-3'; *IGFBP7*, 5'-GGGTCACTATGGAGTTCAAAGG-3' and 5'-GCATGGCACTCATATTCTCCA-3'; *GATA3*, 5'-CCGCCCTACTACGGAAACTC-3' and 5'-CAGGGTAGGGATCCATGAAG-3'; *ASNS*, 5'-ATCCGTATTTGTGGCTCTGTTA-3' and 5'-TTGCTCAATTCCTCCTTTGTC-3'; *COX7A1*, 5'-GAACCGCTTTCAGAACCGAG-3' and 5'-CCCAGCCAAGGGAGTACAAG-3'. The gene *COX7A1* was used as a BMSCs-specific control gene to verify the lack of contamination by stromal cells in the harvested ALL cells. PCR reactions were carried out in 25 µL containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 5% DMSO, 0.5 µM ROX Reference Dye (Invitrogen), 1x SYBR Green (Amresco), 1 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 5 pmol of each primer and 5 µL of diluted cDNA (5x dilution). Experiments were carried out in duplicate. The cycling protocol consisted of 2 minutes at 95°C for denaturation, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 30 s and extension at

72°C for 30 s. Fluorescence was measured at 72°C. A standard melting-curve cycle was used to check the quality of amplification to ensure that primer dimers were not being formed during PCR.

Cell survival/proliferation by MTT assay. Primary B-precursor ALL cells (2×10^5 cells) were seeded onto subconfluent BMSCs layers in 96-well plates in 100 μ l of AIM-V medium supplemented with different combinations of asparaginase (0.9 IU/ml), rIGFBP7 (100 ng/ml) and insulin (500 ng/ml). After incubation for 72 hours, cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 100 μ L PBS containing 0.5 mg of MTT per ml, then incubated at 37°C for 6 h, pelleted again and solubilized with 150 μ L isopropanol. Formazan product was measured by determining the absorbance at 560 nm using a microplate reader. Triplicate wells of BMSCs layers alone were included as controls to record the contribution of these cells in the reduction of MTT. MTT reduction by stromal cells alone resulted in an OD representing little more than half of the OD seen in the majority of coculture assays with patients' samples. Moreover, BM stromal cells seemed to be resistant to asparaginase levels up to 10 IU/ml (Supplementary Figure 2A). Therefore, the effects of asparaginase treatment on OD values of MTT assays most likely represent differences in ALL cell survival.

4. MÉTODOS COMPLEMENTARES

4.1. MIGRAÇÃO E ADESÃO

Os ensaios de migração foram realizados pelo sistema de transwell. Neste ensaio 0,2e6 células de linhagens de leucemia foram ressuspensas em 100uL de meio RPMI com 10% de soro e colocadas na câmara superior. Os diferentes tratamentos consistiram na adição de IGFBP7 (100ng/mL) e/ou insulina (500ng/mL) às células colocadas na câmara superior. Após 24 horas de cultura todas as células que passaram para a câmara inferior foram contadas para análise de número de células que migraram.

Para o ensaio de adesão as células estromais foram cultivadas até um estado de sub-confluência. As linhagens leucêmicas foram marcadas com $^{51}\text{Na}_2\text{CrO}_3$, lavadas, e 0,05e6 células foram adicionadas a camada de estroma. Após incubação por 24 horas, as células não aderidas foram cuidadosamente lavadas e as células aderidas foram solubilizadas com 100uL de Triton X-100 e contadas no contador gama.

4.2. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR - ENSAIO DE MTT

Para os ensaios de resistência à dexametasona e metotrexato, as linhagens de LLA-B ou T transduzidas com vetores lentivirais contendo sh.Scramble ou sh.IGFBP7 (0,05e6 células), foram cultivadas com diferentes concentrações de dexametasona (REH – 30ug/ml; RS4;11 – 2,88ng/ml; 697 – 0,1ng/ml; HPB – 3ug/ml; Jurkat 3ug/ml; TALL – 0,17ug/ml) e metotrexato (REH – 17,0nM; RS4;11 – 30,0nM; 697 – 14,5nM; HPB – 7,5nM; Jurkat – 15,0nM; TALL – 5,6nM) por 72 horas, e ao final deste período de incubação a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Para os ensaios de resistência com as células primárias de LLA (0,2e6 células), as células foram cultivadas em meio AIM-V na presença

de dexametasona (14,6ug/mL) por 48 horas, em duplicatas. Para estes experimentos ainda foram adicionadas as proteínas recombinantes humanas IGFBP7 (100ng/mL) e/ou seu ligante (IGF1 – 200ng/mL; ou insulina - 500ng/mL). Foram realizados um controle onde nada foi adicionado ao meio de cultura, e outro onde foi adicionada apenas a dexametasona.

4.3. AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DA LLA EM MODELOS ANIMAIS

Camundongos Scid NOD.CB17-Prkdcscid/J adquiridos da Jackson Laboratory, foram mantidos no CEMIB, Centro de Bioterismo da UNICAMP. Para estes experimentos, 10 milhões de células da linhagem de LLA RS4;11, transduzidas com partículas lentivirais carregando sh.Scramble ou sh.IGFBP7, foram injetadas nos camundongos através da veia caudal. Após a inoculação, a leucemia nos animais foi monitorada semanalmente pela análise de 50 µL de sangue periférico. A fração mononuclear do sangue foi separada por gradiente de ficoll e posteriormente marcada com anticorpo anti-hCD45 e submetidas à análise de citometria de fluxo para determinação da porcentagem de células humanas CD45(+).

5. RESULTADOS COMPLEMENTARES E DISCUSSÃO

Nesta seção serão discutidos mais detalhadamente alguns pontos do artigo científico, bem como resultados complementares e perspectivas para a continuidade do trabalho.

5.1. IGFBP7 E INSULINA/IGF1 NA RESISTÊNCIA À ASPARAGINASE

Ao longo dos anos, diversos autores relataram que a interação das células leucêmicas com as células estromais da medula óssea são de grande importância para que as primeiras resistam aos sinais pró-apoptóticos mediados pela ação dos diferentes compostos quimioterápicos. Esta interação, leucemia-estroma, faz com que diferentes vias de sinalização sejam ativadas nas células leucêmicas, levando a uma supressão da expressão de proteínas pró-apoptóticas e estimulação da expressão de proteínas anti-apoptóticas (Pifer *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004).

No presente estudo, foi possível observar que a interação das células leucêmicas com as células estromais promoveu, nas células de LLA, a modulação da expressão de diferentes genes relacionados com a resistência e a sensibilidade à ação da asparaginase. Como o *IGFBP7* mostrou maior nível de alteração da expressão, e devido a sua ação extracelular e disponibilidade de proteína recombinante, ele foi selecionado para estudos subsequentes.

Com o silenciamento da expressão do *IGFBP7* em linhagens celulares de LLA B-precursora (**figura 2A do manuscrito**) ou LLA-T (**figura 5A da tese**), pode-se observar que a *IGFBP7* produzida pelas próprias linhagens tem um efeito autócrino na proliferação das células de LLA (**figura 2B do manuscrito e figura 5B da tese**), bem como parácrino sobre as células estromais (**figura 2C do manuscrito**). Diversos são os trabalhos que

atribuem à IGFBP7 um efeito supressor tumoral, tais como inibição da proliferação e indução de senescência celular (Wajapeyee *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Benatar *et al.*, 2011). Em 2010, Heesch *et al.* mostraram que a adição da proteína IGFBP7 inibiu significativamente a proliferação de linhagens de LLA-T. Entretanto em 2011, Hu *et al.* mostraram que o silenciamento do gene *IGFBP7*, em linhagens de LMA, diminuiu a proliferação destes tipos celulares. Além do efeito na proliferação, as células com *IGFBP7* silenciado tiveram uma queda na taxa de adesão e migração. Nos nossos ensaios de adesão, observamos que o tratamento com IGFBP7:insulina aumentou, significativamente, a adesão das células de linhagens de LLA-B derivadas às células estromais (**figura 6A**), bem como a migração destes tipos celulares (**figura 6B**).

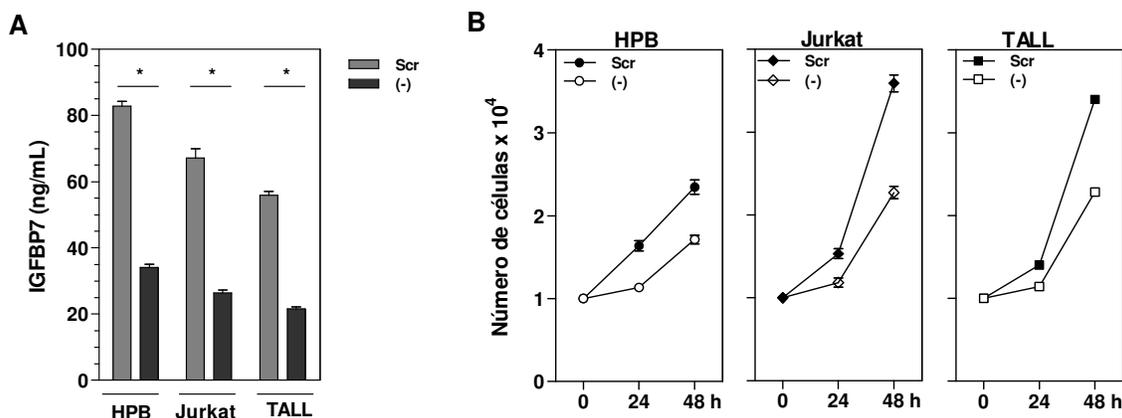


Figura 5. Efeito do IGFBP7 na proliferação das células de LLA-T. (A) Diminuição da IGFBP7 no meio de cultura das linhagens HPB, Jurkat e TALL; transduzidas por partículas lentivirais carregando shRNAs contra *IGFBP7* ou uma sequência aleatória não codificante. O meio de cultura foi coletado após 24 horas e os níveis de IGFBP7 medidos por ELISA. As barras representam a média \pm SEM. (-), células com sh.IGFBP7; scr, representa as células transduzidas com sh.Scramble. (B) As células transduzidas com sh.IGFBP7 ou sh.Scramble foram cultivadas em meio RPMI-10% e a proliferação foi avaliada em diversos tempos por contagem do número de células viáveis em citometria de fluxo. Os pontos representam a média \pm SEM.

O aparente conflito no papel do *IGFBP7* pode decorrer do contexto celular analisado. No caso da LLA-T, os autores utilizaram concentrações elevadas de rIGFBP7,

sendo que em nossas condições pudemos observar que o uso de concentrações superiores a 1ug/ml tem uma atividade inibitória na proliferação da LLA. Os níveis plasmáticos de IGFBP7, em amostras de medula de crianças saudáveis ou com LLA, não são superiores a 150ng/ml (ver manuscrito). Em todo caso, devido à ligação da IGFBP7 a diferentes componentes da matriz extracelular, é possível que em alguns contextos celulares e nichos da medula as concentrações de IGFBP7 sejam bem maiores.

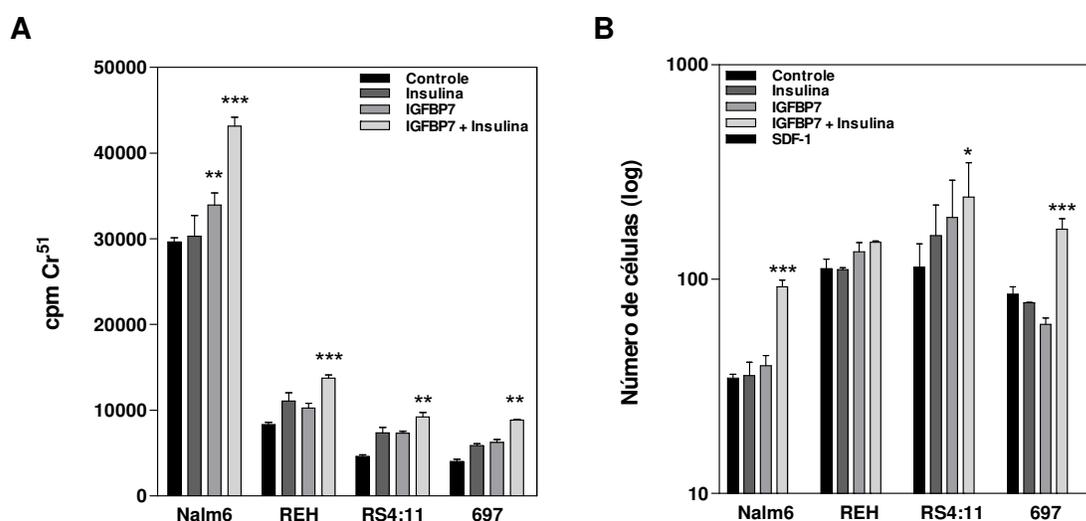


Figura 6. Influência da adição de IGFBP7 e/ou insulina na adesão e migração das linhagens de LLA-B. (A) As linhagens de LLA foram marcadas com Cr⁵¹, co-cultivadas sobre a camada de hTERT-MSCs e tratadas com IGFBP7 (100ng/mL) e/ou insulina (500ng/mL). Após 24 horas as células não aderidas foram lavadas e a radiatividade foi mensurada em Beta-counter. Tratamentos foram realizados em triplicatas. (B) As linhagens foram cultivadas em sistema de transwell e estimuladas com IGFBP7 e/ou insulina. Após 24 horas as células que migraram foram contadas para avaliar as diferenças entre os tratamentos. Os tratamentos consistiram na adição de insulina (500ng/mL), ou IGFBP7 (100ng/mL) ou na adição de ambos na câmara inferior. As diferenças foram avaliadas utilizando 2way ANOVA e Bonferroni posttest (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

A asparaginase é um dos principais quimioterápicos utilizados nas fases de indução da remissão ou intensificação do tratamento contra a LLA infantil. Ela atua reduzindo os níveis de asparagina e glutamina no sangue, no líquido cérebro espinhal e na medula óssea (Irino et al., 2004). Como as células de LLA apresentam baixa atividade

intracelular de asparagina sintetase (ASNS), proteína responsável pela produção de asparagina, elas dependem de uma fonte extracelular deste aminoácido, sendo sensíveis à queda nos níveis de asparagina (Haskell *et al.*, 1969).

Em 2007, Iwamoto *et al.* mostraram que as células mesenquimais da medula óssea tem elevados níveis de expressão de ASNS, sintetizando e secretando asparagina em quantidade suficiente para proteger as células de LLA contra a ação da asparaginase.

Em nosso manuscrito de tese, apresentamos evidências da ação indireta da IGFBP7 sobre a LLA, estimulando o estroma à produção de asparagina, e criando, portanto, uma dinâmica contrária à ação da asparaginase.

Entretanto, este não deve ser o único mecanismo pelo qual a IGFBP7 promoveria a proteção das células leucêmicas à ação da asparaginase. Como podemos observar, o tratamento das células leucêmicas, co-cultivadas com as células estromais, com IGFBP7:insulina elevou a adesão das células de LLA a camada de estroma. Como a IGFBP7 tem um envolvimento na adesão celular, este pode representar um dos mecanismos pelos quais ela participa do aumento da resistência da leucemia à asparaginase, dada à importância da adesão na sobrevivência da leucemia (Manabe *et al.*, 1994). Além disso, sabe-se que o estroma estimula o aumento de *BCL-2* na LLA, por uma via de sinalização ainda não completamente desvendada. Uma vez que as IGFs atuam induzindo o aumento de *BCL-2*, é possível que a ação da IGFBP7, ao aumentar a disponibilidade e a viabilidade das IGFs, seja a via (ou uma das vias) pela qual se dá a indução da expressão de *BCL-2* nas LLAs nas co-culturas, promovendo assim a quimioresistência.

È importante ressaltar que o modelo proposto aponta para uma sinalização bidirecional entre as células leucêmicas e estromais, em que as células estromais estimulam a expressão de *IGFBP7* pelas células de LLA, que de forma dependente de insulina/IGFs

aumentam a produção e secreção de asparagina pelas células estromais, atenuando os efeitos citotóxicos da asparaginase (**figura 7**).

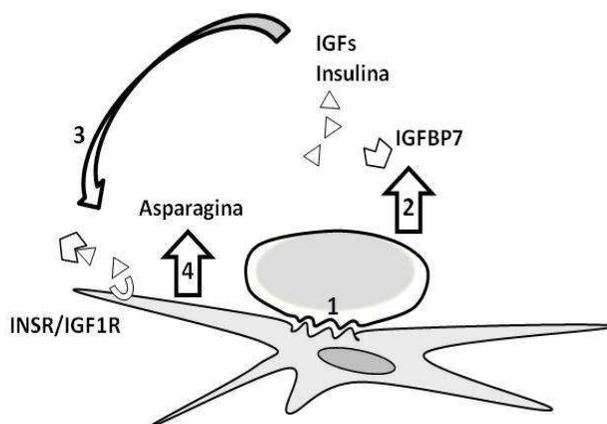


Figura 7. Mecanismos de ação da IGFBP7 na resistência a quimioterapia da LLA. *Mecanismo de resistência dependente de estroma:* (1) as células leucêmicas ao interagirem com as células do estroma (2) aumentam a expressão e secreção de *IGFBP7*. (3) *IGFBP7* extracelular se liga a IGFs/insulina incrementando a disponibilidade desses fatores de crescimento para as células do estroma, (4) que assim estimuladas, aumentam biossíntese (expressão de *asparaginase*) e secreção de asparagina. O aumento nos níveis de asparagina favorece as células leucêmicas frente à ação da asparaginase.

Sabendo que a *IGFBP7* é produzida tanto pela LLA quanto pelo estroma, será que a *IGFBP7* da LLA é mesmo relevante? Neste sentido, um dos aspectos mais importantes do nosso manuscrito foi mostrar que a LLA é a principal fonte de *IGFBP7* na medula óssea de pacientes ao diagnóstico, em que a medula está grandemente infiltrada pelos blastos leucêmicos. O que pode não ser verdade no caso de uma doença residual mínima, a não ser quando se considera a composição heterogênea dos diferentes nichos da medula óssea, como pequenos “santuários” para o refúgio da LLA.

Com relação à associação dos níveis de expressão de *IGFBP7* com o grau de maturação da LLA, alguns trabalhos mostraram que o *IGFBP7* é muito mais expresso nas LLA-T de fenótipo imaturo (Early T Phenotype) - as quais apresentam pior resposta clínica – em comparação com as demais LLA-T (Coustan-Smith *et al.*, 2009; Heesch *et al.*, 2010).

Da mesma forma, quando associamos nossos dados de expressão de *IGFBP7* com o grau de maturação da LLA-B, observamos que os fenótipos mais imaturos (LLA pró-B CD10 negativo) apresentaram maiores níveis de expressão deste gene (**figura 8**). A ausência de CD10 normalmente está associada com rearranjos *MLL*, mais precisamente a t(4;11), que está relacionada com uma pior sobrevida (Pui *et al.*, 2003; Pieters *et al.*, 2007). Entretanto, não se sabe ao certo se a ausência de CD10 tem um impacto prognóstico significativo de forma independente da presença do rearranjo *MLL* (Moricke *et al.*, 2004). Entretanto, nossos dados não apontam para a associação entre CD10(-) e a presença do rearranjo acima citado.

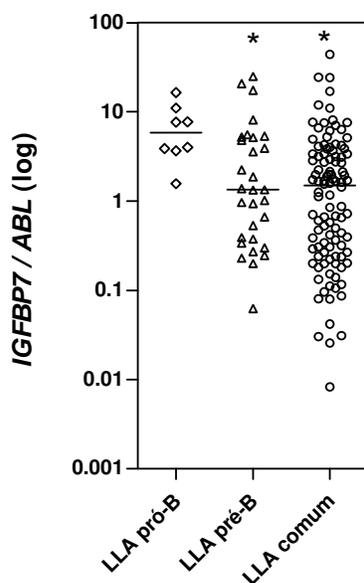


Figura 8. Associação dos níveis de expressão de *IGFBP7* com o imunofenótipo. As amostras de células primárias de pacientes com LLA-B derivada foram agrupados de acordo com o grau de maturação das células leucêmicas. As diferenças foram comparadas usando teste-t não paramétrico (Mann-Whitney).

5.2. PAPEL DA IGFBP7 NA PROGRESSÃO DA LLA EM MODELOS ANIMAIS (NOD/SCID)

Para investigar o papel *in vivo* da IGFBP7 produzida pela LLA, iniciamos experimentos de transplante de LLA em camundongos imunossuprimidos NOD/SCID. Apresentamos nesta tese dados preliminares com a linhagem RS4;11 sh.Scramble e sh.IGFBP7. Os diferentes clones da linhagem RS4;11 foram inoculadas pela veia caudal dos camundongos NOD/SCID e amostras de sangue periférico foram colhidas semanalmente para diagnóstico. A fração mononuclear do sangue foi separada por gradiente de ficoll e posteriormente marcada com anticorpo anti-hCD45 e submetidas à análise de citometria de fluxo para determinação da porcentagem de células humanas CD45(+). De acordo com os dados obtidos, notamos que existe uma diferença na progressão da leucemia e na sobrevivência dos modelos animais; sendo que a expressão do *IGFBP7* se mostrou positivamente relacionada com uma evolução mais rápida da leucemia e um pior prognóstico (**figura 9**).

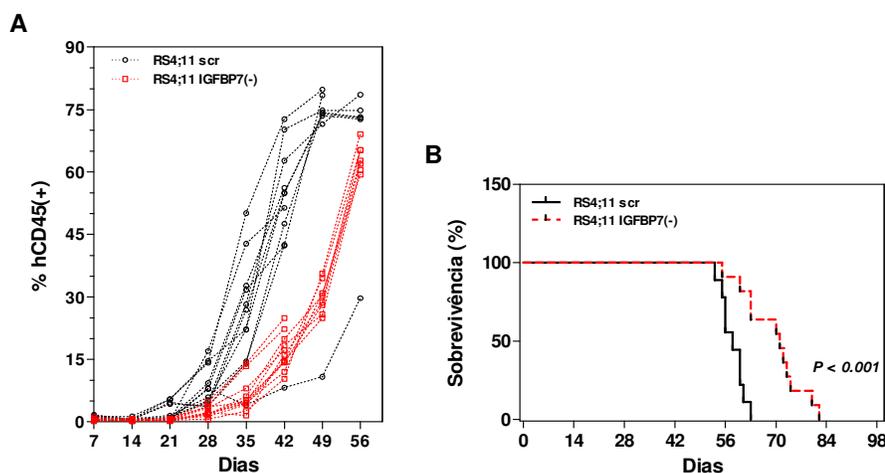


Figura 9. Impacto do silenciamento do *IGFBP7* na progressão da linhagem de LLA RS4;11 em camundongos NOD/SCID. (A) Animais foram transplantados com RS4;11 transduzida com o vetor sh.Scramble ou o sh.IGFBP7. A quantidade de células leucêmicas foi avaliada semanalmente no sangue periférico por marcação com hCD45(+) e análise em citometria de fluxo. (B) Análise da sobrevivência dos camundongos transplantados com RS4;11 sh-Scramble versus RS4;11 sh-IGFBP7.

Como continuidade, pretendemos realizar ensaios com um maior número de linhagens de LLA, e avaliar se existe uma diferença na “pega”, progressão, infiltração de órgãos extra-medulares e quimioresistência da leucemia em função do *IGFBP7*.

Além disso, poderemos avaliar a presença de focos de LLA na medula em remissão citológica (< 5% de blastos), e se estes estariam associados à maior expressão de *IGFBP7*.

5.3. IGFBP7 NA RESISTÊNCIA A DIFERENTES QUIMIOTERÁPICOS

Apesar dos dados anteriores sugerirem que a *IGFBP7* tem um importante papel na resistência a asparaginase, o impacto do *IGFBP7* na sobrevida dos pacientes tratados com poliquimioterapia sugere que este gene tem um papel importante na resistência a outros quimioterápicos.

Como mencionado anteriormente, as IGFs e insulina são fatores de sobrevivência para um grande número de tipos celulares (Schofield e Engstrom, 1992), incluindo as células de LLA (Estrov *et al.*, 1991; Baier *et al.*, 1992a; Baier *et al.*, 1992b; Neely *et al.*, 1992). A *IGFBP7* tem uma baixa afinidade de ligação a esses fatores, desta forma ela não compete com os receptores da insulina e IGFs, aumentando a meia-vida e as atividades mitogênicas destes fatores (Akaogi *et al.*, 1996a; Oh *et al.*, 1996). Sabe-se que estes fatores atuam de forma autócrina em células de LMA. Como as células de LMA expressam receptores funcionais de IGF1 e também tem uma produção autócrina de IGF1, esse mecanismo atuaria ativando a via de PI3K e levando a resistência a apoptose (Tamburini *et al.*, 2008).

Da mesma forma foi observado que as células primárias de LLA resistentes à radiação ionizante apresentavam, após radiação, maior fosforilação (ativação) do IR e IGF1R, mas também um incremento na expressão de genes da via da insulina e IGF1. Sugerindo desta forma que a via da insulina/IGF1 seria um possível mecanismo compensatório de sobrevivência celular também nesta doença (Marston *et al.*, 2009).

Embora a LLA produza pequenas quantidades de IGFs (**Figura 10**), as células de estroma da medula óssea produzem tanto IGF1 quanto IGF2, logo, o microambiente da LLA é rico nestes fatores de crescimento, além da insulina e IGFs circulantes.

Nossos resultados preliminares sugerem que as células de LLA têm receptores funcionais para a insulina e IGF1. Os dados de microarranjos de DNA obtidos com amostras de mais de 100 casos de LLA indicam expressão de *IR*, *IGF1R* e *IGF2R*, além de vários componentes das vias de sinalização da insulina/IGFs, embora de maneira heterogênea, como é típico da LLA (**Figura 10**). A mesma heterogeneidade é vista em linhagens de LLA (**Anexo 1**).

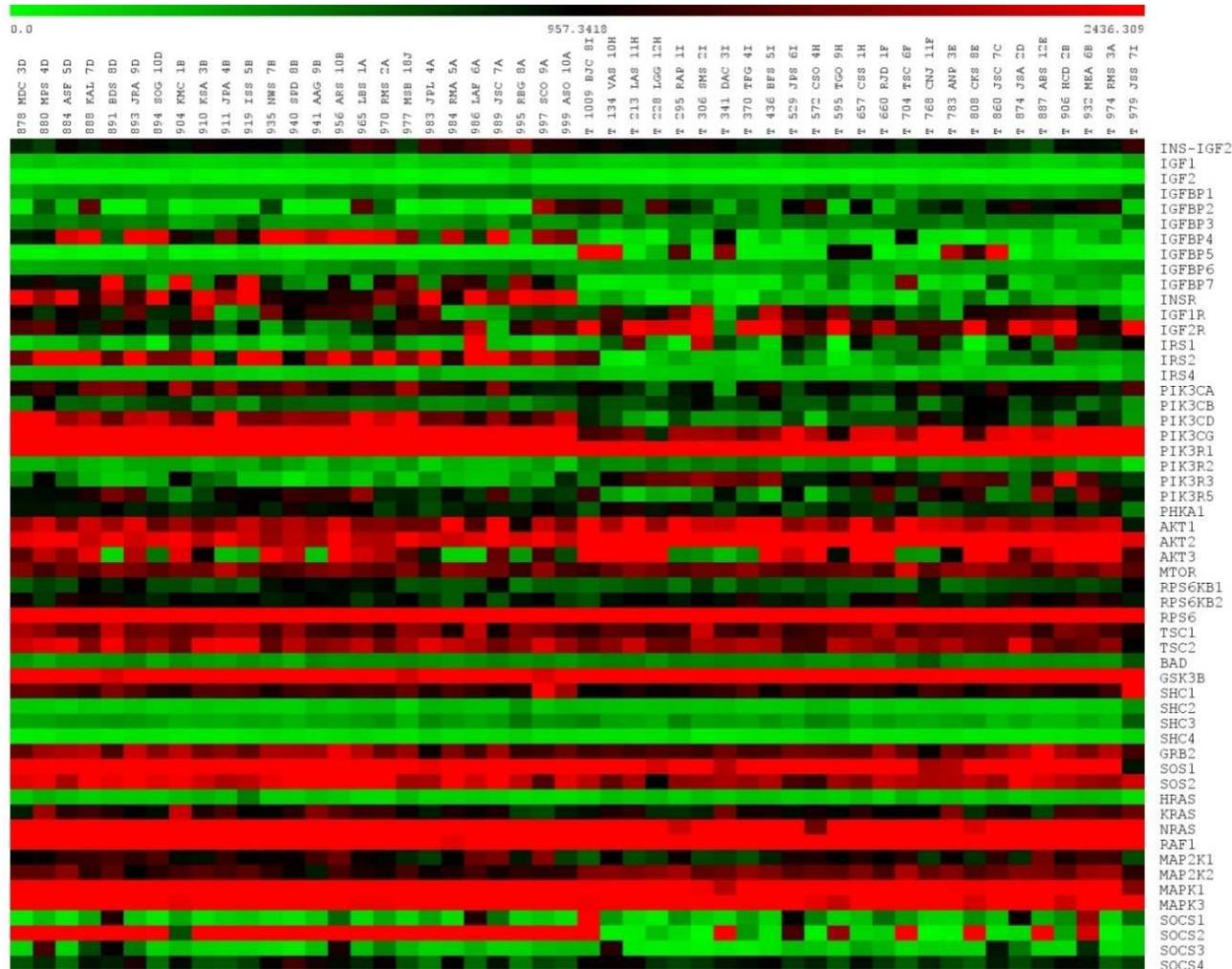


Figura 10. Heatmap de expressão dos principais genes da via de sinalização da insulina/IGFs na LLA pediátrica. A expressão gênica foi avaliada com microarrays Gene1.0 ST (Affymetrix) e analisada com o programa Bioconductor usando algoritmo Plier16. Amostras nas colunas e genes nas linhas. Amostras cujo nome começa com um “T” correspondem a LLA-T, sendo as demais LLA B-derivadas. Vermelho, maior expressão.

Desta forma a IGFBP7:insulina/IGF1 poderia promover a resistência à apoptose independente do estroma, ou seja, atuando diretamente nas células leucêmicas (**figura 11**).

A fim de avaliar o papel da IGFBP7, produzida pelas próprias linhagens de LLA, na resistência a outros compostos quimioterápicos, utilizamos as linhagens sh.Scramble e sh.IGFBP7 em ensaios de resistência a dexametasona e metotrexato, que são dois importantes quimioterápicos para o tratamento da LLA.

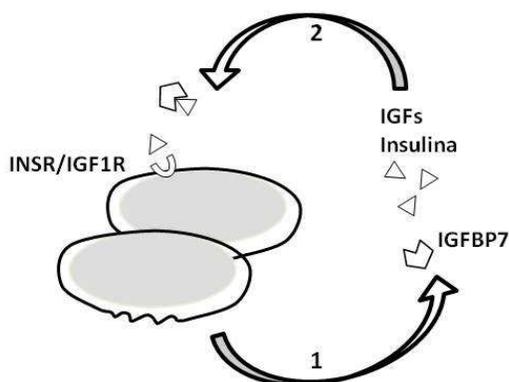


Figura 11. Mecanismos de ação da IGFBP7 na resistência a quimioterapia da LLA. Mecanismo de resistência independente de estroma: a IGFBP7, produzida pelas células leucêmicas (1), interage e aumenta meia vida ou disponibilidade de IGFs/insulina; e o (2) conjunto IGFBP7:ligante atua de forma anti-apoptótica sobre as células leucêmicas.

A escolha do metotrexato para as análises de resistência se devem ao fato de que diferentes trabalhos associaram elevados níveis de expressão de *IGFBP7* a resistência a este quimioterápico (Daí *et al.*, 2006; Györff *et al.*, 2006; Selga *et al.*, 2009). A resistência a glicocorticóides na LLA é relacionada à maior atividade glicolítica, provavelmente pela via AKT/mTOR. Uma vez que a insulina/IGFs agem no metabolismo da glicose e na via AKT/mTOR é plausível seu envolvimento na resistência a glicocorticóides. Além disso, a investigação da resistência à ação dos glicocorticóides é de extrema importância, já que diversos autores mostraram que a sua resistência está relacionada com uma maior probabilidade de recaída e pior prognóstico em pacientes com LLA (Dordelmann *et al.*,

1999; Kaspers *et al.*, 2005). Portanto, escolhemos o metotrexato e a dexametasona para avaliar o impacto do *IGFBP7* na sua resistência.

Para isso as linhagens celulares de LLA foram cultivadas com diferentes concentrações de dexametasona e metotrexato. Como podemos observar na **figura 12A**, o silenciamento do *IGFBP7* tornou todas as linhagens de LLA mais sensíveis à ação da dexametasona. Entretanto, pode-se observar que o nível de resistência entre os diferentes tipos celulares é variado.

Com relação ao metotrexato (**figura 12B**), apenas três linhagens mostraram maior resistência do sh.Scramble *versus* sh.IGFBP7, enquanto nenhum efeito significativo pode ser observado nas outras linhagens testadas.

As diferenças na resposta, das diferentes linhagens celulares testadas, à ação dos diferentes quimioterápicos testados refletem a grande heterogeneidade da LLA (Pui *et al.*, 2011). Embora o efeito observado seja independente do estroma, não podemos afirmar se é ou não independente de insulina/IGFs. Provavelmente seja dependente de insulina/IGFs, pois as culturas foram realizadas com meio RPMI com a adição de SFB 10%. Neste caso, as diferentes citocinas, assim como a insulina e IGFs presentes no soro, poderiam estar atuando em conjunto com a *IGFBP7* e promovendo a resistência à ação dos quimioterápicos.

Os mecanismos pelo qual a *IGFBP7*:insulina/IGFs atuam promovendo a resistência aos diferentes compostos quimioterápicos ainda serão investigados. Entretanto, deve-se manter em mente que talvez a *IGFBP7* possa estar atuando de forma independente da insulina e IGFs na promoção da resistência à quimioterapia. Como é sabido, as *IGFBPs* podem atuar sobre as células por um mecanismo dependente ou independente de IGFs. Neste mecanismo de atuação independente, as *IGFBPs* poderiam desencadear a sinalização

pela ligação a receptores putativos na superfície celular, ou até mesmo exercer seus efeitos pela ativação transcricional de genes quando transportadas para o núcleo via sinais de localização nuclear (Mohan e Baylink, 2002).

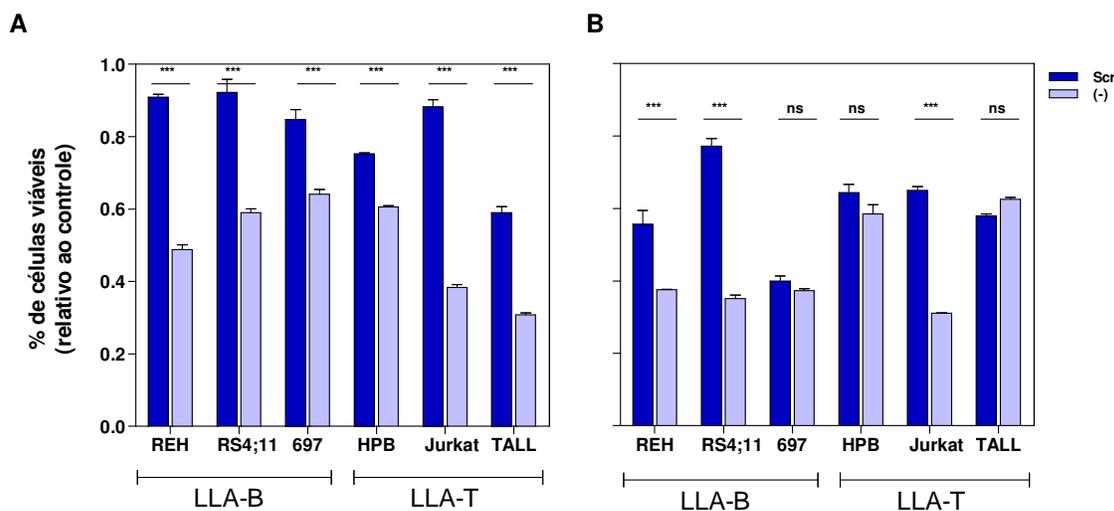


Figura 12. Resistência das linhagens de LLA à ação de diferentes compostos quimioterápicos. (A) As linhagens de LLA transduzidas por partículas lentivirais carregando sh.IGFBP7 (-); ou sh.Scramble (scr), foram cultivadas em meio RPMI-10% e submetidas a ação da dexametasona por 72 horas. Após esse período a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. As barras representam a média ± SEM. (B) As linhagens de LLA (-) ou (scr), foram cultivadas em meio RPMI-10% e submetidas a ação do metotrexato por 72 horas. Após esse período a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. As barras representam a média ± SEM. As diferenças foram avaliadas utilizando 2way ANOVA e Bonferroni posttest (***) $P < 0,001$.

Em experimentos preliminares com células primárias de LLA B-derivada, cultivadas sem estroma, a adição de IGFBP7:insulina se mostrou capaz de induzir resistência à dexametasona (corticóide) (Figura 13A). Resultados semelhantes foram obtidos quando a insulina foi substituída por IGF1 (Figura 13B).

Em resumo, pode-se observar que a IGFBP7:ligantes podem atuar na resistência das células de LLA à ação de diferentes compostos quimioterápicos de maneira dependente ou independente das células estromais. Entretanto, novos experimentos são necessários para se elucidar completamente os mecanismos pelos quais estes fatores poderiam estar atuando

diretamente sobre as células leucêmicas e assim promovendo a sua resistência a quimioterapia. Além disso, pretende-se avaliar o papel da IGFBP7 na progressão e resistência a quimioterapia, em experimentos a serem realizados *in vivo* em modelos animais de leucemia (NOD/SCID).

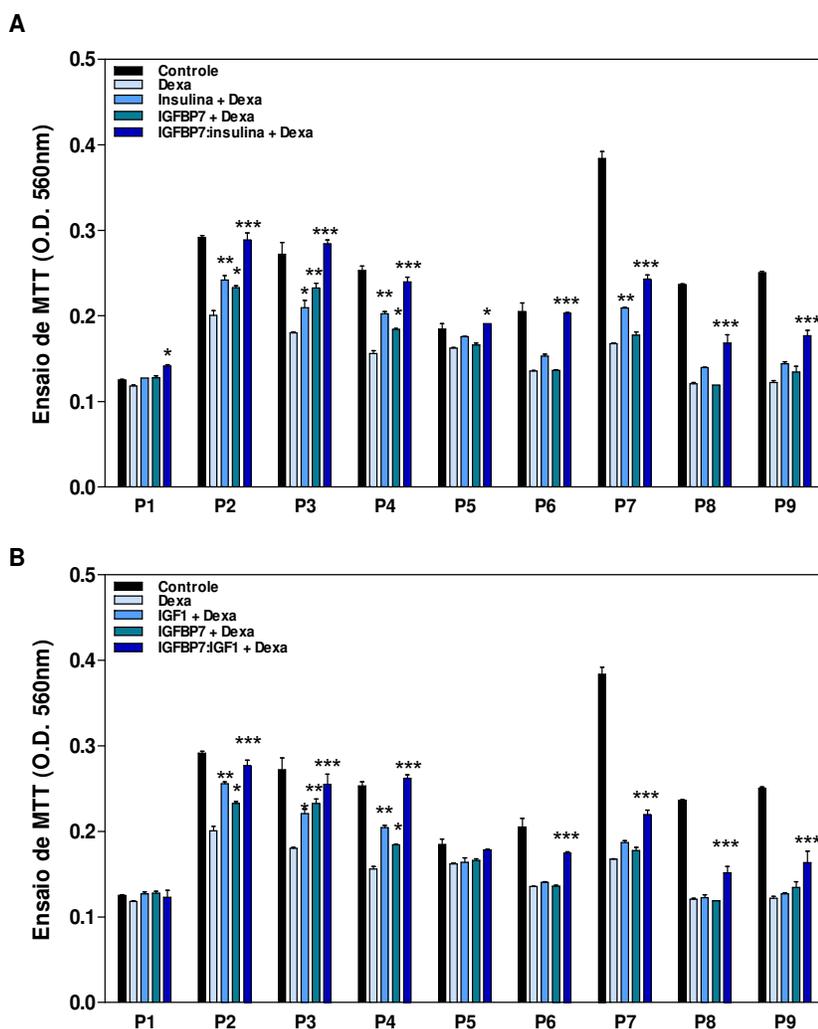


Figura 13. Resistência das células primárias de LLA B-derivada à ação da dexametasona, mediado pela adição de IGFBP7:insulina/IGF1. (A) As células primárias de leucemia foram cultivadas por 48h em meio AIM-V e submetidas à ação da dexametasona (14,6 ug/mL), adicionado ou não de insulina (500ng/mL) e/ou IGFBP7 (100ng/mL). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os tratamentos foram realizados em duplicatas. Em (B) foram realizados os mesmos tratamentos, mas a insulina foi substituída por IGF1 (200ng/mL). As diferenças foram avaliadas utilizando 2way ANOVA e Bonferroni posttest (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

6. CONCLUSÕES

- A IGFBP7 produzida pelas células leucêmicas pode atuar tanto de forma autócrina, quanto parácrino na sobrevivência e proliferação das células de LLA e células do estroma da medula óssea.

- As células estromais estimulam a expressão de *IGFBP7* pelas células de LLA. A IGFBP7 secretada pelas células de LLA atua sobre as células estromais da medula óssea, de forma dependente de insulina/IGFs, levando ao aumento da produção e secreção de asparagina pelas células estromais, atenuando os efeitos citotóxicos da asparaginase em cultura.

- A adição de IGFBP7:insulina aumentou a adesão e migração das linhagens de LLA, o que pode estar contribuindo para a resistência a asparaginase.

- Maior expressão de *IGFBP7* pelas células de LLA está associada a pior sobrevida livre de leucemia dos pacientes tratados segundo o protocolo GBTLI LLA-99.

- O silenciamento do *IGFBP7*, em linhagens de LLA, atenuou a progressão da leucemia e aumentou a sobrevida dos camundongos NOD/SCID transplantados com estas células.

- O silenciamento do *IGFBP7*, em linhagens celulares de leucemia, tornou as células mais sensíveis à ação da dexametasona e do metotrexato, de maneira independente do estroma.

7. ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DE DOUTORAMENTO

- Laranjeira AB, de Vasconcellos JF, Sodek L, Spago MC, Fornazim MC, Tone LG, Brandalise SR, Nowill AE, Yunes JA. IGFBP7 participates in the reciprocal interaction between acute lymphoblastic leukemia and BM stromal cells and in leukemia resistance to asparaginase. **Leukemia**. 2011 Oct 18. doi: 10.1038/leu.2011.289. [Epub ahead of print].
- Cardoso BA, de Almeida SF, Laranjeira AB, Carmo-Fonseca M, Yunes JA, Coffey PJ, Barata JT. TAL1/SCL is downregulated upon histone deacetylase inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia**. 2011 Oct;25(10):1578-86.
- Silva A, Laranjeira AB, Martins LR, Cardoso BA, Demengeot J, Yunes JA, Seddon B, Barata JT. IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. **Cancer Res**. 2011 Jul 15;71(14):4780-9.
- de Vasconcellos JF, Laranjeira AB, Zanchin NI, Otubo R, Vaz TH, Cardoso AA, Brandalise SR, Yunes JA. Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**. 2011 Apr;56(4):568-77.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi Y; *et al.* (2001) Expression of angiomodulin (tumor-derived adhesion factor/MAC25) in invading tumor cells correlates with poor prognosis in human colorectal cancer. **Int. J. Cancer** 95:216-222.

Akaogi K; *et al.* (1996a) Synergistic growth stimulation of mouse fibroblasts by tumor-derived adhesion factor with insulin-like growth factors and insulin. **Cell Growth Differ.** 7:1671-1677.

Akaogi K; *et al.* (1996b) Specific accumulation of tumor-derived adhesion factor in tumor blood vessel and in capillary tube-like structure of cultured vascular endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93:8384-8389.

Alessi P; *et al.* (2004) Molecular targeting of angiogenesis. **Biochem. Biophys. Acta.** 1654:39-49.

Astier AL; *et al.* (2003) Temporal gene expression profile of human precursor B leukemia cells induced by adhesion receptor: identification of pathways regulating B-cell survival. **Blood** 101:1118:1127.

Baier TG; *et al.* (1992a) Characterization of insulin-like growth factor I receptors of human acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cell lines and primary ALL cells. **Eur. J. Cancer** 28A:1105-1110.

Baier TG; *et al.* (1992b) Influence of antibodies against IGF-I, insulin or their receptors on proliferation of human acute lymphoblastic leukemia cell lines. **Leuk. Res.** 16:807-814.

Benatar T; *et al.* (2011) IGFBP7 reduces breast tumor growth by induction of senescence and apoptosis pathways. **Breast Cancer Res.** Oct 14 [Epub ahead of print]

Bergers G; Benjamin LE. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat. Rev. Cancer**, 3:401-410.

Bergfeld SA; *et al.* (2010) Bone marrow-derived stem cells and the tumor microenvironment. **Cancer Metastasis Rev.** 29:249-262.

Biéche I; *et al.* (2004) Molecular profile of inflammatory breast cancer: identification of a poor prognosis gene expression signature. **Clin. Cancer Res.** 10:6789-6795.

Billips LG; *et al.* (1992) Differential roles of stromal cells, interleukin-7, and kit-ligand in the regulation of B lymphopoiesis. **Blood** 79:1185-1192.

Bissell MJ; Radisky D. Putting tumours in context. (2001) **Nature Reviews** 1:46-54.

Burger JA; *et al.* (2009) The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. **Blood** 114:3367-3375.

Carrol WL; Raetz EA. (2012) Clinical and Laboratory Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **J. Pediatr.** 160:10-18.

Chapuis N; *et al.* (2010) IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody. **Haematologica** 95:415-23.

Chauncey TR. (2001) Drug resistance mechanisms in acute leukemia. **Curr. Opin. Oncol.** 13:21-26.

Chen D; *et al.* (2011) Insulin-like growth factor-binding protein-7 functions as a potential tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. **Clin. Cancer Res.** 17:6693-6701.

Cheung WC; Van Ness B. (2001) The bone marrow stromal microenvironment influences myeloma therapeutic response *in vitro*. **Leukemia** 15:264-271.

Clutter SD; *et al.* (2005) MMP-2 is required for bone marrow stromal cell support of pro-B-cell chemotaxis. **Exp. Hematol.** 33:1192-1200.

Cobaleda C; Garcia IS. (2009) B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin. **BioEssays** 31:600-609.

Coustan-Smith E; *et al.* (2009) Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet Oncol.** 10:147-56.

Dahl GD; *et al.* (2008) Bone marrow stroma cells regulate TIEG1 expression in acute Lymphoblastic leukemia cells: Role of TGFb/BMP-6 and TIEG1 chemotherapy scape. **Int. J. Cancer** 123:2759-2766.

Daí Z; *et al.* (2006) Prediction of anticancer drug potency from expression of genes involved in growth factor signalling. **Pharm Res.** 23:336-349.

Davidoff AM. (2010) Pediatric oncology. **Semin. Pediatr. Surg.** 19:225-233.

Dawczynski K; *et al.* (2003) Changes of serum growth factors (IGF-I,-II and IGFBP-2,-3) prior to and after stem cell transplantation in children with acute leukemia. **Bone Marrow Transplant.** 32:411-415.

Degeorges A; *et al.* (1999) Human prostate cancer express the low affinity insulin-like growth factor binding protein IGFBP-rP1. **Cancer Res.** 59:2787-2790.

Den Boer ML; *et al.* (1998) Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. **Blood** 91:2092-2098.

Den Boer ML; Pieters R. (2007) Microarray-based identification of new targets for specific therapies in pediatric leukemia. **Curr. Drug Targets** 8:761-764.

Dordelmann M; *et al.* (1999) Prednisone Response Is the Strongest Predictor of Treatment Outcome in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood** 4:1209-1217.

El-Shewy HM; Luttrell LM. (2009) Insulin-like growth factor 2/Mannose-6 phosphate receptors. In Vitamins and hormones: Insulin and IGFs. **Ed. Gerald Litwack. Elsevier** Vol 80, pp 667-697.

Estrov Z; *et al.* (1991) Human growth hormone and insulin-like growth factor-1 enhance the proliferation of human leukemic blasts. **J. Clin. Oncol.** 9:394-399.

Fortney JE; *et al.* (2001). Bone marrow stromal cells regulate caspase 3 activity in leukemic cells during chemotherapy. **Leuk. Res.** 25(10):901-907.

Genua M; *et al.* (2009) c-ABL and insulin receptor signaling. In Vitamins and hormones: Insulin and IGFs. **Ed. Gerald Litwack. Elsevier** Vol 80, pp 77-105.

Georges RB; *et al.* (2011) The insulin-like growth factor binding proteins 3 and 7 are associated with colorectal cancer and liver metastasis. **Cancer Biol. Ther.** 12:69-79.

Gibson LF; *et al.* (1993) Insulin-like growth factor-1 potentiates expansion of interleukin-7-dependent pro-B cells. **Blood** 82:3005-3011.

Girard JP, *et al.* (1999) Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. **Am. J. Pathol.** 155:2043-2055.

Graux C. (2011) Biology of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Clinical and therapeutic relevance. **Transfus. Apher. Sci.** 44:183–189.

Györfy B; *et al.* (2006) Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations. **Int. J. Cancer** 118:1699–1712.

Hall BM; *et al.* (2004) Stromal cells expressing elevated VCAM-1 enhance survival of B lineage tumor cells. **Cancer Lett.** 207:229-239.

Hanahan D; Weinberg RA. (2000) Hallmarks of Cancer. **Cell** 100:57-70.

Hanahan D; Weinberg RA. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell** 144:646-674.

Haskell CM; *et al.* (1969) Asparaginase resistance in human leukemia-asparagine synthetase. **Biochem. Pharmacol.** 18:2578-2580.

He Y; *et al.* (2010) The insulin-like growth factor-1 receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, suppresses survival and resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia cells. **Oncol. Res.** 19:35-43.

Heesch S; *et al.* (2010) BAALC-associated gene expression profiles define IGFBP7 as a novel marker in acute leukemia. **Leukemia** 24:1429-1436.

Holleman A; *et al.* (2004) Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. **N. Engl. J. Med.** 351:533-542.

Hu S; *et al.* (2011) Function and expression of insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7) gene in childhood acute myeloid leukemia. **Pediatr. Hematol. Oncol.** 28:279-287.

Irino T; *et al.* (2004) Establishment of Real-Time Polymerase Chain Reaction method for quantitative analysis of asparagine synthetase expression. **J. Mol. Diagn.** 6:217-224.

Iwamoto S; *et al.* (2007). Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. **J. Clin. Invest.** 117:1049-1057.

Jensen M; De Meyts P. (2009) Molecular Mechanism of differential intracellular signaling from the insulin receptor. In Vitamins and hormones: Insulin and IGFs. **Ed. Gerald Litwack. Elsevier** Vol 80, pp 51-75.

Jiang W; *et al.* (2008) Insulin-like growth factor binding protein 7 mediates glioma cell growth and migration. **Neoplasia** 10:1335–1342.

Kaspers GJL; *et al.* (2005) Immunophenotypic cell lineage and *in vitro* cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukaemia. **Euro. J. Cancer** 41:1300-1303.

Kerbel R; Folkman J. (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. **Nat. Rev. Cancer** 2:727-739.

Keyhani A; *et al.* (2001) Angiogenesis and leukemia. **Leuk. Res.** 25:639-645.

Konopleva MY; Jordan CT. (2011) Leukemia Stem Cells and Microenvironment: Biology and Therapeutic Targeting. **J. Clin. Oncol.** 29:591-599.

Landreth KS; *et al.* (1992) Insulin-like growth factor-I regulates pro-B cell differentiation. **Blood** 80:1207-1212.

Lagneaux L; *et al.* (1998) Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. **Blood** 91:2387-2396.

Leal SM; *et al.* (1999) Interactions of high affinity insulin-like growth factor-binding proteins with the type V transforming growth factor-beta receptor in mink lung epithelial cells. **J. Biol. Chem.** 274:6711–6717.

LeRoith,D; Roberts CTJr. (2003) The insulin-like growth factor system and cancer. **Cancer Lett.** 195:127–137.

Leverrier Y; *et al.* (1999) Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. **Cell Death Differ.** 6:290-296.

Liotta LA; Kohn EC. (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature** 411:375-379.

Manabe A; *et al.* (1992) Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Blood** 79:2370-2377.

Manabe A; *et al.* (1994) Adhesion dependent survival of normal and leukemic human B lymphoblasts on bone marrow stromal cells. **Blood** 83:758-766.

Marie JP. (2001) Drug resistance in hematologic malignancies. **Curr. Opin. Oncol.** 13:463-469.

Marshman E; Streuli CH. (2002) Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in mammary gland function. **Breast Cancer Res.** 4:231–239.

Marston E; *et al.*(2009) Stratification of pediatric ALL by in vitro cellular responses to DNA double-strand breaks provides insight into the molecular mechanisms underlying clinical response. **Blood** 113:117-26.

Medyouf H; *et al.* (2011) High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. **J. Exp. Med.** 208:1809-22.

Misaghian N; *et al.* (2009) Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. **Leukemia** 23:25-42.

Mohan S; Baylink DJ. (2002) IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and –independent mechanisms. **J. Endocrinol.** 175:19-31.

Moreno A; *et al.* (2001) Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood** 97:242-249.

Möricke A, *et al.* (2004) Prognostic factors in CD10 negative precursor b-cell acute lymphoblastic leukemia in children: data from three consecutive trials ALL-BFM 86, 90, and 95. [Abstract] **Blood** 104:A-1957,540a.

Mudry RE; *et al.* (2000) Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. **Blood** 96:1926-1932.

Nagakubo D, *et al.* (2003) A high endothelial venule secretory protein, mac25/angiomodulin, interacts with multiple high endothelial venule-associated molecules including chemokines. **J. Immunol.** 171: 553-561.

Nagasawa T. (2006) Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. **Nat. Rev. Immun.**, 6:107-116.

Neely EK; *et al.* (1992) Mitogenic effects of human recombinant insulin on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia** 6:1134-1142.

Oh Y; *et al.* (1996) Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II. **J. Biol. Chem.** 271:30322-30325

Ogawa M; *et al.* (2000) Cytokines prevent dexamethasone- induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line. **Cancer Res.** 60:4262-4269.

Osman I; *et al.* (2006) Novel biomarkers of human urinary bladder cancer. **Clin. Cancer Res.** 12:3374-3380

Pieters R; den Boer ML. (2003) Molecular pharmacodynamics in childhood leukemia. **Int. J. Hematol.** 78:402-413.

Pieters R, *et al.* (2007) A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. **Lancet** 370:240-250.

Pifer J; *et al.* (2003). Role of stromal cells and their products in protecting young and aged B-lineage precursors from dexamethasone-induced apoptosis. **Mech. Ageing Dev.** 124:207-218.

Pollak MN; *et al.* (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia. **Nat. Rev. Cancer** 4:505-518.

Pui CH, *et al.* (2003) Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. **Leukemia** 17:700-706.

Pui CH; *et al.* (2004) Acute lymphoblastic leukemia. **N. Engl. J. Med.** 350:1535-1548.

Pui CH. (2010) Recent research advances in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **J. Formos. Med. Assoc.** 109:777-787.

Pui CH; *et al.* (2011) Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. **J. Clin. Oncol.** 29:551-565.

Raaijmakers MHGP. (2011) Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system. **Haematologica** 96:1041-1048.

Rafii S. *et al.* (1997) Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. **Leuk. Lymphoma** 27:375-386.

Rosenfeld RG; *et al.* (1999) The insulin-like growth factor binding protein superfamily: new perspectives. **Pediatrics** 104:1018-1021

Ross JA; *et al.* (1996) Big babies and infant leukemia: a role for insulin-like growth factor-1? **Cancer Causes Control** 7:553-559.

Sachdev D; Yee D. (2001) The IGF system and breast cancer. **Endocr. Relat. Cancer** 8:197-209.

Sarkar S, *et al.* (2002) The role of AKT and RAFTK in b1 integrin mediated survival of precursor B acute lymphoblastic leukemia cells. **Leuk. Lymphoma** 43:1663-1671.

Sato J; *et al.* (1999) Identification of Cell-Binding Site of Angiomodulin (AGM/TAF/Mac25) That Interacts With Heparan Sulfates on Cell Surface. **J. Cell. Biochem.** 75:187-195.

Schofield PN; Engstrom W. (1992) Insulin-like growth factors in human cancer. In: Schofield PN, ed. The insulinlike growth factors. Structure and biological function. **Oxford: Oxford University Press** 241-257.

Selga E; *et al.* (2009) Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate. **Genome Med.** 1:83.

Sensebe L; *et al.* (1997) The broad spectrum of cytokine gene expression by myoid cells from the human marrow microenvironment. **Stem Cells** 15: 133-143.

Shain KH; *et al.* (2000) The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for de novo drug resistance. **Curr. Opin. Oncol.** 12:557-563.

Shao L, *et al.* (2004) Detection of the differentially expressed gene IGF-binding protein-related protein-1 and analysis of its relationship to fasting glucose in Chinese colorectal cancer patients. **Endocr. Relat. Cancer** 11:141-148.

Sinnett D; *et al.* (2006) Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers – the childhood leukemia experience. **Familial Cancer** 5:35-47.

Smith MA; *et al.* (1999). Leukemia. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995, National Cancer Institute, SEER Program. S. M. Ries LAG, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR (eds). Bethesda, MD, NIH Pub. No. 99-4649: 17-34.

Smith MT; *et al.* (2005) Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 206:237-245.

Smith MA. (2009) Update on developmental therapeutics for acute lymphoblastic leukemia. **Curr. Hematol. Malig. Rep.** 4:175-82.

Suda T; *et al.* (2005) Hematopoietic stem cells and their niche. **TRENDS Immunol.** 26:426-433.

Sun X; *et al.* (2005) Molecular characterization of tumour heterogeneity and malignant mesothelioma cell differentiation by gene profiling. **J. Pathol.** 207:91-101.

Tamburini J; *et al.* (2008) Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. **Blood** 111:379-82.

Tissing WJ; *et al.* (2003) Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia.** 17:17-25.

Toorok-Storb B; *et al.* (1999) Dissecting the marrow microenvironment. **Ann. NY Acad. Sci.** 872:164-170.

Tu W; *et al.* (2000) Insulin-like growth factor 1 promotes cord blood T cell maturation and inhibits its spontaneous and phytohemagglutinin-induced apoptosis through different mechanisms. **J. Immunol.** 165:1331-1336.

Wajapeyee N; *et al.* (2008) Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. **Cell** 132:363-374.

Wang L; Fortney JE; Gibson LF. (2004). Stromal cell protection of B-lineage acute lymphoblastic leukemic cells during chemotherapy requires active Akt. **Leuk. Res.** 28:733-742.

Wang L; *et al.* (2005). VEGF-induced phosphorylation of Bcl-2 influences B lineage leukemic cell response to apoptotic stimuli. **Leukemia** 19:344-353.

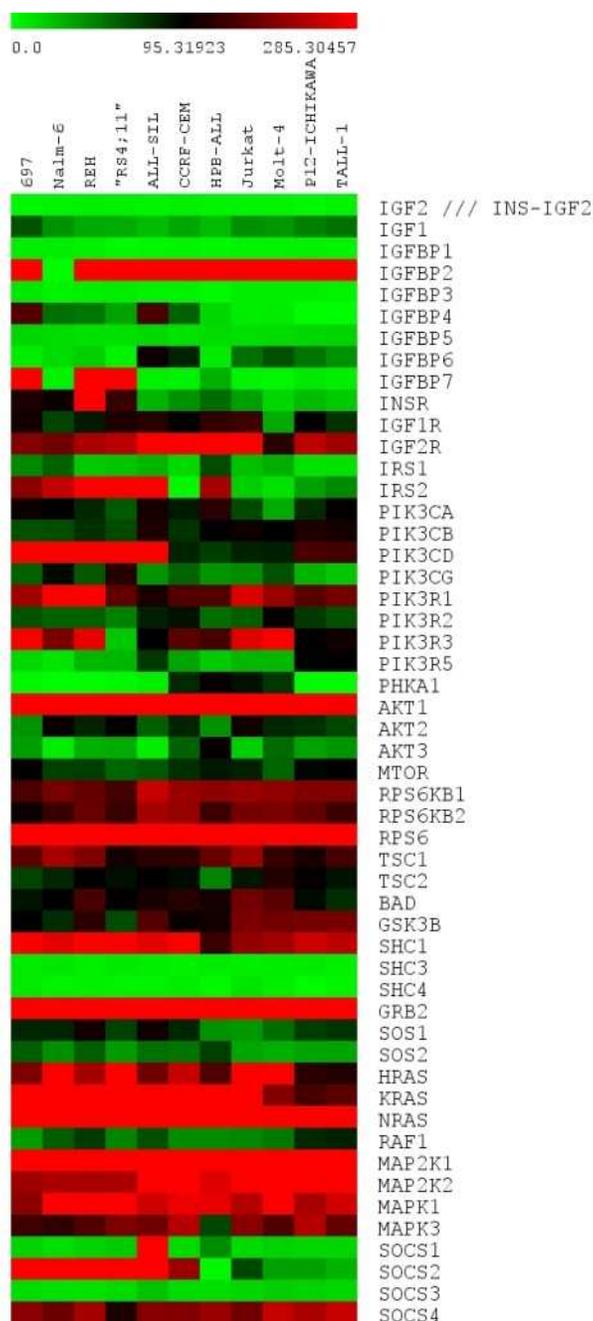
Wahner Hendrickson AE; *et al.* (2009) Expression of insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor-1 receptor in human acute myelogenous leukemia: effect of the dual-receptor inhibitor BMS-536924 *in vitro*. **Cancer Res.** 69:7635-43.

Whelan JT; *et al.* (2008) HoxA9 induces insulin-like growth factor-1 receptor expression in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia** 22:1161-9.

Wolf NS. (1999) The hematopoietic microenvironment: stromal cell types: characterization and function *in situ* and *in vitro*. **Hematol.** 4:241-254.

Wu S; *et al.* (2005) Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression. **Leuk. Res.** 29:63-72.

Anexo 1. Heatmap de expressão dos principais genes da via de sinalização da insulina/IGFs em diferentes linhagens de LLA. A expressão gênica foi avaliada com microarrays HG133 Plus 2.0 (Affymetrix) e analisada com o programa Bioconductor usando algoritmo Plier16. Amostras nas colunas e genes nas linhas. São linhagens LLA B-derivadas a 697, Nalm-6, REH e RS4;11, sendo as demais LLA-T. Vermelho, maior expressão. Notar que em comparação com as linhagens LLA B-derivadas as LLA-T expressam menos IGFBP7. Mesmo assim, algumas expressam níveis consideráveis de IGFBP7, segundo avaliamos por ELISA no sobrenadante das culturas (dados não apresentados).



Anexo 2. Parecer Comitê de ética

 **FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**
www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 16/12/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1133/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0018.0.144.146-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "IGFBP7 E A QUIMIORESISTÊNCIA DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA".
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ângelo Brunelli Albertoni Laranjeira
INSTITUIÇÃO: Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini.
APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/12/2008
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 16/12/09 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Averiguar se o IGFBP7 exerce um efeito direto sobre as células de LLA, bem como caracterizar outros de seus ligantes além da insulina. Estudar o efeito do IGFBP7 sobre a expressão de genes implicados na biossíntese de asparagina e transportadores de aminoácidos, bem como moléculas implicadas na resistência a apoptose. Pretende-se também a quantificação da expressão de IGFBP7 e ligantes em amostras diagnósticas de LLA e estabelecer uma relação com fatores clínico-biológicos dos pacientes.

III - SUMÁRIO

Serão avaliadas amostras de medula óssea de 200 pacientes com LLA, cujo material encontra-se no Banco de células do I. Boldrini. Para os testes com células estromais será utilizado uma linhagem de células imortalizadas, obtidas em centro de pesquisa. Será realizada análise da viabilidade celular (ensaio MTT), PCR em tempo real, análise de aminoácidos por RMN, citometria de fluxo e Western Blot.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. Todos os documentos estão corretamente anexados. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pode ser dispensado por utilizar material biológico de banco.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Joséão Vieira de Camargo, 126
Cidade Postal 6131
13064-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -

Anexo 2. Parecer Comitê de ética (Continuação)



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 16 de dezembro de 2008.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

Anexo 3. Parecer Comitê de ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 12/02/09.
(Grupo II)

PARECER CEP: Nº 1105/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
CAAE: 0014.0.144.146-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA E PI3K NA RESISTÊNCIA A DROGAS DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Andrés Yunes.

INSTITUIÇÃO: Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/12/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 12/02/10 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

1- Quantificar aminoácidos no meio de cultura de células de estroma da medula óssea tratadas com IGFBP7 + ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2); 2- Avaliar efeito de IGFBP7+ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2) na sobrevivência de células primárias de LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA) frente à asparaginase, quando em cultura de curta duração, sem estroma; 3- Avaliar efeito de IGFBP7+ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2) na expressão de mRNA de ASNS, glutamina sintetase (GS) e de transportadores de aminoácidos nas células de LLA e do estroma; 4- Tratar células de LLA com diferentes doses de EBIO e verificar viabilidade celular frente a diferentes doses de daunorubicina, quantificando a incorporação intracelular da droga através de citometria de fluxo; 5- Desvendar o mecanismo de fluxo intracelular ligado ao KCNN4, usando substratos e inibidores específicos para os diferentes transportadores; 6- Analisar distribuição intracelular da daunorubicina em células de LLA tratadas ou não com EBIO, por microscopia de fluorescência e co-marcação de lisossomos com LysoTracker blue, do Golgi com NBD-C6-Ceramida e do retículo endoplasmático com DiOC6; 7- avaliar uso do clotrimazol (ou TRAM-34) na sensibilização das células de LLA aos agentes quimioterápicos, in vitro e in vivo (em camundongos); 8- Quantificar níveis de mRNA de GPR56 em amostras de 150 pacientes com LLA e buscar associações com características biológico-clínicas dos pacientes; 9- Confirmar a expressão da proteína GPR56 na superfície das células de LLA, por imunocitoquímica; 10- Sequenciar os exons 3,5,8 e 9 de GPR56 em 30 amostras de DNA ou cDNA de blastos de pacientes e de linhagens de LLA. Serão analisados 3 grupos de pacientes: (i) com doença extramedular ao diagnóstico, (ii) com baixa expressão de GPR56 (<0,05 moléculas de GPR56/ABL), (iii) grupo de pacientes com expressão de GPR56 na mediana; 11- silenciar o GPR56 por iRNA em uma linhagem de LLA e analisar resistência das células a asparaginase quando em cultura com ou sem estroma de medula óssea.

III - SUMÁRIO

O autor relata que 20% a 30% das crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) sofrem recaídas da doença e apresentam maior resistência aos quimioterápicos. Métodos modernos de

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Cordeiros - SP

fone (019) 3821-9136
fax (019) 3821-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -

Anexo 3. Parecer Comitê de ética (Continuação)



análise de expressão gênica possibilitam a identificação de genes relacionados ao processo de resistência à drogas. Segundo referências apresentadas pelo autor, as células da recaída são altamente proliferativas e mesmo assim mais resistente à quimioterapia, esse processo pode estar relacionado com a maior expressão de genes de reparo do DNA e de anti-apoptose, que compensariam os efeitos da quimioterapia. A interação de blastos leucêmicos com as células estromais da medula óssea (obs: o estroma é o tecido conjuntivo de sustentação de um órgão) aumenta a resistência da LLA à leucemia.

Dois sub-projetos fazem parte do projeto maior. No primeiro a proposta é estudar a função dos genes IGFBP7, KCNN4 e GPR56 na resistência à drogas para o tratamento de LLA, no contexto da interação leucemia-estroma. Para realização desses sub-projeto serão incluídas amostras de sangue/medula óssea de crianças portadoras de leucemia linfóide aguda, sem tratamento prévio, atendidas integralmente no Centro Infantil Boldrini, a pesquisa será feita com o restante do material colhido para diagnóstico e não acarretará em nenhum procedimento ao paciente. É prevista a utilização de 150 amostras retrospectivas. São descritos os procedimentos para obtenção de amostras com, pelo menos, 85% de blastos leucêmicos, basicamente centrifugação diferencial e filtração. As amostras são preservadas em nitrogênio líquido. O controle será feito com amostras provenientes de doadores normais e de pacientes com resultado negativo após exame. O DNA de indivíduos normais será obtido de cartões de triagem neonatal (CIPOI-UNICAMP). Os testes laboratoriais serão realizados com amostras não identificadas e descartadas após seu uso. Segundo o autor a pesquisa com o DNA de tecido estocado não precisa de autorização, desde que seja mantido o anonimato do depositante. O teste de viabilidade e apoptose celular será realizado em cultura em placa, sendo adicionados os produtos de estudo (IGFBP7, insulina, IGF-1, IGF-2, EBIO, clotrimazol, AS605240, daunorubicina, vincristina, asparaginase, corticóide) e avaliação final será colorimétrica.

A quantificação da expressão gênica será por extração total de RNA e síntese de DNA e os mesmos primers utilizados para o PCR também serão usados no sequenciamento.

No segundo sub-projeto existe a proposta de seqüenciar o cDNA de IL-7R, e o domínio JH2 de Jak1 e Jak3, dos blastos leucêmicos de 50 casos de LLA-T (linhagem linfocitária - T). Os dados de polimorfismos do IL-7R serão comparados com frequências publicadas da população caucasiana. Além disso, pretende-se analisar a frequência dos mesmos polimorfismos em amostras de 40 indivíduos saudáveis da nossa população. Caso seja encontrada alguma mutação no IL-7R ou Jak, o cDNA mutante será clonado, assim como o receptor IL-2R, e ambos serão transfectados em células HEK293 e uma série de testes será realizada.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

Anexo 3. Parecer Comitê de ética (Continuação)



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na 1 Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de janeiro de 2009.


Prof. Dra. Carmem Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

Anexo 4. Parecer Comitê de Ética Animal



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

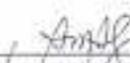
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1766-1, sobre "Estudo da via PI3K/AKT/mTOR na Leucemia Linfóide Aguda Pediátrica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Andrés Yunes / Gilberto C. Franchi Jr., está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 16 de março de 2009.

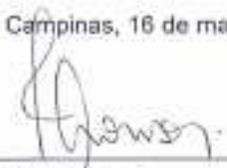
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1766-1, entitled "Studies of PI3K/AKT/mTOR pathway in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 16, 2009.

Campinas, 16 de março de 2009.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 5106
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6399
E-mail: comis@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>