

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CIÊNCIAS MÉDICAS**

**CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE CÉLULAS
PROGENITORAS BCR/ABL-POSITIVAS
DURANTE O CULTIVO *IN VITRO***

ELVIRA ALICIA APARICIO CORDERO

Orientadora:

Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Co-orientadora:

Profa. Dra. Nance Beyer Nardi

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2003

AGRADECIMENTOS

- Ao povo brasileiro por sempre ter-me acolhido com muito carinho.
- A UFRGS, ao HCPA, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina - Clínica Médica e em Genética e Biologia Molecular, seu corpo docente e administrativo por seu ensino.
- Às entidades financiadoras pelo investimento que fazem na pesquisa.
- Aos pacientes, por proporcionar as amostras para fazer esta pesquisa.
- Ao pessoal médico e administrativo do Serviço de Hematologia Clínica do HCPA.
- Às amigas com quem levei as aulas na pós: Claudia Astirraga, Cristina Lissott, Katia Delgado, Luciana Campos, Márcia Bueno, Mônica Vinhas, Sandrine Wagner.
- Aos amigos Elvem, Karin, Gustavo, Alessandra, Dayanne, Ana, Cheila, Cristina e Guilherme por sempre lembrar de mim nas quintas à tarde.
- À eficiente Secretária de Hematologia do HCPA Neusa Layder por sua amizade e paciência. Mil desculpas por tantas correrias.
- Ao grupo do Laboratório de Imunogenética.
- Andrés Delgado Cañedo e Ivan Schuller por su interminable ayuda.
- Alessandra Peres por sempre estar junto.
- Lindolfo Meirelles por sua amizade e muitas dicas nos experimentos.
- Pedro, Tábita, Nice, Tassi, Claudiram por compartilharem um espaço pequeno de trabalho de tantos experimentos.
- Zeca, Marion, Eduardo, Luiza, Melissa, Flavia, Camila, Igor, Aline, Sharon, Tati, e dona Dilma.
- Aos professores do NIUE/UFRGS, entre eles: Fernando Seffner, Paulo Guedes, Maria Stephanou, Ana Mariza Filipouski, Diana Marchi, Maria da Graça Paiva, Iara Neves.
- A Janer Bittencourt, suas filhas Patricia e Priscila por estarem sempre junto e dispostas a me ajudar.

- A Karla Valkimil por sua imensa amizade e toda sua família.
- A Andreia Kist Fernandes e sua mãe dona Herta por seus atendimentos e tantas horas de “parla”.
- Aos compatriotas e amigos imigrantes por sempre fazer-me “olvidar” do espanhol.
- A todos os amigos cefavianos, entre eles: Cleverson, Janaína, José, Karina, Kátia, Lissandra Luciana, Marcia, Nonato, Patricia, Ricardo, Rodrigo, Ronaldo, Roberto Sergio, Sidnei, Tiago.
- Aos mil amigos que fiz: muito obrigada por sua amizade e por fazerem que nunca me sentisse sozinha.
- A minhas “entranháveis” amigas de Faculdade Rochi e Rossy.
- A Luís Ricardo por tudo!

Todo grande sonho não nasce sozinho. Cada pedaço da realização tem o suor, a dedicação e a harmonia de quem sonharam juntas. Aqui estou eu, feliz por poder realizar esse grande sonho e compartilhá-lo com as pessoas que me ajudaram. O mínimo que posso dizer é: **Muito Obrigada!**

Elvira

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Para as professoras que ensinara-me que: O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto (Thomas Huxley)

- A Prof. Lúcia Silla, por ter-me acolhido sem conhecer-me e sempre estar disposta a tantas conversinhas. “Mil gracias”

- A Prof. Amiga Nance Nardi, por sua paciência e compreensão, “*muchas gracias*” por todo, por guiar-me e despertar o interesse da Imunogenética desde suas primeiras aulas e creio que nossa historia continuara....

DEDICATORIA

A mi querida familia, que siempre comprendieron y aceptaron mis decisiones,
solamente espero no haberles decepcionado.

Mis padres Augusto Sergio e Irma Enma

A mi hermano Sergio Orestes

A mis queridos tíos, primos por siempre acordarse y escribirme.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS.	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ANEXOS.	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DA LITERATURA	21
Leucemia Mielóide Crônica	21
Tratamento da LMC	22
Cromossomo Philadelphia BCR/ABL	27
Os genes c-ABL e BCR	29
Os mRNAs BCR/ABL	30
Características das células BCR/ABL	32
JUSTIFICATIVA.	37
OBJETIVOS	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA.	39
ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS:	48
Abstract	49
Introduction	50
Material and methods	51
Results and discussion	53
References	56
ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS :	60
Resumo	61
Introdução	62
Materiais e métodos	63
Resultados e discussão	65
Referências	68
ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS:	72
Abstract	73
Introduction	74
Materials and methods	75
Results and discussion	77
References	78

ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS	81
Resumo	82
Introdução	83
Materiais e métodos	84
Resultados e discussão	86
Referências	87
Anexos	
Texto para coleta de dados	90
Termo de consentimento informado	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ABL	Gene ABL
BCR/ABL	Fusão dos genes BCR e ABL
APC	Células apresentadoras de antígenos
BCR	Região de agrupamentos de pontos de quebra (<i>breakpoint cluster region</i>)
CD	Antígeno marcador de superfície (<i>Cluster of differentiation</i>)
CFS _s	Fator estimulador de colônia (<i>colony stimulating factor</i>)
c-kit	Fator receptor da célula tronco
CLP	Células precursoras linfóides
CMP	Células progenitoras mielóides
CSF	Fator estimuladora de colônia
DECH	Doença enxerto-contra-hospedeiro
DMR	Doença residual mínima
EPO	Eritropoietina
G-CSF	Fator estimulador de colônias - granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias - granulócito/monócito
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HSC	Célula tronco hematopoietica (<i>hematopoietic stem cell</i>)
INF α	Interferon alfa
IFN γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
LMC	Leucemia mielóide crônica
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LTC	Cultura de longo termo
m-BCR	Região secundária de pontos de quebra (<i>Minor breakpoint cluster region</i>)
M-BCR	Região principal de pontos de quebra (<i>Major breakpoint cluster region</i>)
M-CSF	Fator estimulador de colônias - monócito
mRNA	RNA mensageiro
NK	Células <i>Natural Killer</i>
Ph	Cromossomo Philadelphia
p190	Proteína de peso molecular 190kD

p210	Proteína de peso molecular 210kD
p230	Proteína de peso molecular 230kD
STI571	Mesilato de imatinibe
T _C	Linfócito T citotóxicos
T _H	Linfócito T auxiliar (<i>helper T</i>)
TMO	Transplante de medula óssea
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF β	Fator de necrose tumoral beta
v-abl	Vírus Abelson da leucemia murina
μ -BCR	Região micro de pontos de quebra (<i>Micro breakpoint cluster region</i>)
RT-PCR	Reação da polimerase em cadeia por transcriptase reversa

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Hematopoese.** As HSCs podem se subdividir em progenitoras de longa duração (*long term*) e de curta duração (*short term*) e progenitores multipotentes (*multipotent progenitor*). Essas progenitoras originam precursores linfóides (CLP) e progenitores mielóides (CMP). Modificado de Reya et al., 2001¹³. 17
- Fig. 2. Mecanismo de ação do STI571.** A tirosina quinase BCR/ABL é constituída por uma quinase ativa que liga-se a ATP e transfere fosfatos da ATP para resíduos de tirosinas em vários substratos. O excesso de proliferação de células mielóides caracteriza a LMC. STI571 funciona bloqueando a ligação do ATP com a tirosina quinase BCR/ABL, inibindo sua atividade. Na ausência da atividade da tirosina quinase o substrato requerido para a função do BCR/ABL não pode ser fosforilado e subseqüentes eventos celulares são abolidos. Modificado de Mauro & Druker (2001)⁴⁷. 25
- Fig. 3.** Representação esquemática dos genes ABL, BCR e BCR-ABL. Os exons são mostrados como retângulos claros para o ABL e escuros para o BCR. 28
- Fig. 4. O cromossomo Philadelphia.** A translocação recíproca t(9;22)(q34;q11) origina o cromossomo Philadelphia. A translocação leva à fusão de uma porção do gene BCR, localizado no cromossomo 22, com o segmento do gene ABL, no cromossomo 9. Resultando em tres diferentes proteínas de 190, 210 e 230kDa. Modificado de Faderl *et al.* (1999)³⁰. 30
- Fig. 5. Esquema simplificado dos genes BCR e ABL** indicando *major breakpoint cluster region*. Possíveis transcritos BCR/ABL e as origens das proteínas. Modificado de Haškovec & Polák (1999)⁷⁰. 31
- Fig. 6.** Efeitos da proteína P210+ em células BCR/ABL-positivas no citoesqueleto, adesão celular, apoptose, proliferação da célula tronco e diferenciação de células troncos e progenitores da LMC. Modificado de Jorgensen & Holyoake (2001)⁷³. 32

LISTA DE TABELAS

Artigo científico # 1

Interaction between normal and CML hematopoietic progenitors and stroma during *in vitro* culture / Interação entre estroma e progenitores hematopoéticos normais e de LMC durante cultivo *in vitro*.

Table 1. Patient's characteristics / Tabela 1. Características dos pacientes	58 / 70
Table 2. Cell recovery and frequency of hematopoietic progenitors after co-culture of normal and CML cells / Tabela 2. Células viáveis recuperadas e frequência de progenitores hematopoéticos após co-cultivo de células leucêmicas e normais	59 / 71

Artigo científico # 2

Persistence of BCR/ABL positive progenitor cells during *in vitro* culture / Permanência de células progenitoras BCR/ABL positivas durante cultivo *in vitro*.

Table 1. Patient's characteristics / Tabela 1. Características dos pacientes	79 / 88
Table 2. Number (frequency) of BCR/ABL+ colonies derived from pre-cultivated mononuclear (MN) or CD34+ cells / Tabela 2. Número (frequência) de colônias BCR/ABL+ derivadas de células mononucleares (MN) ou células CD34+ pré-cultivadas.	80/ 89

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1

Texto para coleta de dados 90

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO..... 91

INTRODUÇÃO

O corpo humano consiste de vários níveis de organização estrutural associados entre si: físico-químico, celular, tecidual, de sistemas e de organismo. Um sistema consiste de órgãos relacionados que desempenham uma função comum. Neste trabalho, será abordada a composição do sistema hematopoético, revisando-se sua formação, sobrevivência das células e sua interação com o microambiente, e como o sistema é afetado quando se desenvolve a leucemia mielóide crônica. Após esta parte introdutória e revisão da literatura apresentaremos nossos resultados, obtidos quando trabalhamos com estas células *in vitro*.

A **hematopoese** é o processo responsável pela formação e amadurecimento das diversas células sangüíneas, apresentando regeneração constante e eficiente. Alguns tipos celulares apresentam um período relativamente curto de vida, que varia de horas até poucos meses; não obstante, sub-populações pequenas de células linfóides podem sobreviver num longo período de tempo¹. Nos adultos, o número de novas células sangüíneas produzidas está estimado em torno de 1 trilhão de células/dia², indicando que a regulação da hematopoese requer um sistema de controle extremamente complexo.

O desenvolvimento da hematopoese no ser humano passa por três etapas: a primeira no embrião, denominando-se hematopoese pré-hepática embrionária; com a aparição do fígado temos a segunda etapa, a hematopoese hepática embrionária-fetal onde aparecem os centros de hematopoese; e a terceira e definitiva hematopoese medular pós-fetal que está na medula óssea. Este desenvolvimento acontece continuamente para suprir a necessidade constante de reposição e renovação das células sangüíneas. Entretanto, o organismo pode perder a capacidade de manutenção deste processo contínuo e homeostático, desencadeando-se um processo leucemogênico ou a destruição precoce das células por distúrbios na regulação da morte celular programada ou apoptose.

A medula óssea é o tecido responsável pelo desenvolvimento das células sangüíneas, onde as células hematopoéticas de diferentes linhagens e estágios de maturação encontram-se em íntima relação com células do estroma. No entanto, à medida que o tempo passa a medula de alguns ossos é gradualmente substituída por tecido adiposo.

As células maduras sangüíneas derivam de um pool constante de células indiferenciadas denominadas **células tronco hematopoéticas** (HSC, *hematopoietic stem cell*)³ consideradas células pluripotentes, autorenováveis e capazes de originar e reconstituir as diferentes linhagens de células maduras que se dividem de maneira assimétrica. A HSC humana passa a maior parte de sua vida no estado quiescente ou fase G₀ do ciclo celular⁴, fazendo parte de uma população de células de medula que expressam o marcador CD34, mas não as moléculas associadas com o comprometimento a linhagens específicas⁵. Além de CD34, outros marcadores de superfície e certos corantes têm sido utilizados para a caracterização do fenótipo de célula tronco, que atualmente pode ser definida como CD34⁺, CD38⁻, CD33⁻, Thy^{low}, CD71⁻, CD45RA^{low}, lin-negativo (ausência de marcadores linhagem-específicos), Rh 123^{low} (corante fluorescente rodamina 123), e Ho 33342^{low} (corante de ácido nucléico)⁶. A transição desta célula primitiva a células funcionais ocorre através de vários estágios intermediários, caracterizados pela progressiva perda da capacidade de auto-renovação e restrição à determinada linhagem; a cada divisão, a célula progenitora resultante torna-se mais comprometida e restrita a uma linhagem hematopoética específica (Fig. 1).

Existem duas linhagens celulares principais: a **linfóide** e a **mielóide**⁷.

Os progenitores **mielóides** originam os seguintes tipos celulares:

- Eritrócitos ou hemácias: conhecidos também como glóbulos vermelhos, contêm hemoglobina; são células anucleadas cuja função principal é transporte de oxigênio e nutrientes para todo o organismo.
- Granulócitos:

- Neutrófilos: seu antecessor ontogênico é GM-CFU, são os leucócitos mais abundantes correspondendo a 70–80% do total de granulócitos polimorfonucleares, e têm vida curta (de horas a dias). São importantes no processo de defesa contra infecções, fagocitando antígenos.
- Eosinófilos: constituem 1 a 3% dos leucócitos, são semelhantes morfológica e funcionalmente aos neutrófilos; suas funções principais são nos processos alérgicos e na defesa inespecífica ao secretar grânulos que fazem combate a parasitas como os helmintos.
- Basófilos/Mastócitos: constituem menos do 1% dos leucócitos; são encontrados em pequeno número na circulação sanguínea, sendo freqüentemente localizados nos tecidos. Apresentam grandes quantidades de substâncias envolvidas em reações de hipersensibilidade imediata tais como histaminas, serotonina e heparina.
- Monócitos/Macrófagos: seu antecessor ontogênico é GM-CFU. Os monócitos entram no sangue periférico, migram ao local de ação nos tecidos e sofrem modificação morfológica e metabólica transformando-se em macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APC); desempenhando várias funções como citotoxicidade, secreção de citocinas, quimiotaxia, fagocitose, e pinocitose.
- Megacariócitos: são grandes células cujo volume citoplasmático chega a ser 16 vezes maior que o de células normais; é deste citoplasma que se originam as plaquetas, que desempenham importante papel na coagulação sanguínea.

Os linfócitos são células capazes de reconhecer e distinguir especificamente diferentes determinantes antagônicos. Encontramos nos adultos em torno de um bilhão de linfócitos, o que equivale a 2% do peso corporal. Os progenitores **linfóides** originarão os seguintes tipos celulares:

- Linfócitos B: representam em torno de 5-15% do total de linfócitos circulantes e diferenciam-se em plasmócitos, que produzem imunoglobulinas (anticorpos), participando da imunidade humoral. Seu amadurecimento ocorre na própria medula

óssea. Na ausência de estímulo antigênico, os linfócitos B maduros virgens morrem por apoptose.

- Linfócitos T: são células relacionadas com a imunidade celular participando da resposta imune do hospedeiro contra microorganismos de multiplicação intracelular. As células precursoras $CD34^+CD7^+$ derivadas da célula tronco migram para o timo, onde se diferenciam em linfócitos T maduros. Podem ser divididos em duas populações: T auxiliares (*helper T*, T_H) $CD4^+$; T citotóxicos (T_C) $CD8^+$.
- Células *Natural Killer* (NK): Esta é a terceira população de linfócitos, representando de 15 a 20% dos linfócitos sangüíneos. Sua principal função está na imunidade inata ou inespecífica, já que apresentam a característica de mediar citotoxicidade espontânea, sem sensibilização prévia, contra diversas células alvo tumorais ou infectadas por vírus, poupando células próprias normais e regulando funções do sistema imunológico e hematopoético⁸. A atividade das células NK não é restrita ao HLA de classe I ou II⁹ como é a dos linfócitos T. Estas células são as primeiras a aparecer no sangue periférico após TMO ou quimioterapia, liberam grânulos por exocitose e são rapidamente ativadas e induzidas a proliferar quando acrescenta-se IL-2.

O processo de diferenciação hematopoética depende de interações entre as células tronco e progenitoras e o microambiente a seu redor. Este é composto por vários elementos: fatores de crescimento; células acessórias (monócitos, linfócitos T); matriz extra-celular (fibronectina, glicoproteínas, colágenos, proteoglicanos); hemonectina que liga a precursores granulocíticos; rede micro-vascular; e as células do estroma (adipócitos, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais), que servem como suporte físico de adesão, produzindo citocinas, sinais e mecanismos ainda não bem definidos na regulação da célula tronco¹⁰. Estes elementos estão envolvidos em funções como adesão celular e regulação do crescimento favorecendo a diferenciação da célula quiescente em outras linhagens de acordo as necessidades fisiológicas do organismo^{11,12}.

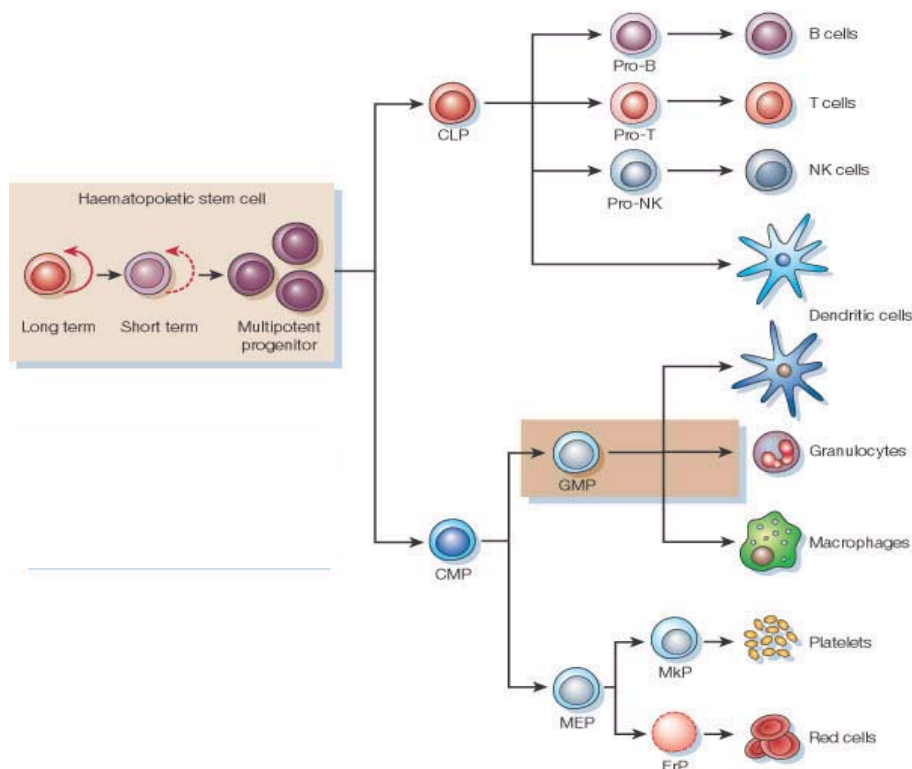


Fig. 1 - Hematopoese. As HSCs podem se subdividir em progenitoras de longa duração (*long term*) e de curta duração (*short term*) e progenitores multipotentes (*multipotent progenitor*). Essas progenitoras originam precursores linfóides (CLP) e progenitores mielóides (CMP). Modificado de Reya *et al.*, 2001¹³.

Uma característica comum aos fatores de crescimento hematopoéticos é o seu tamanho molecular relativamente grande, que impede sua direta penetração na célula alvo. Esta tem em sua membrana um sítio receptor para o fator que, quando ligado, transmite uma mensagem ao interior da célula¹⁴. Estes fatores podem ser classificados como os que atuam predominantemente em diferentes fases de diferenciação celular (precoce ou tardia), os que atuam em uma ou em várias linhagens celulares e os que atuam indiretamente estimulando o crescimento das células, como fatores acessórios¹⁵.

Os principais fatores de crescimento para estimular a formação de colônia (*colony stimulating factors* – CSFs) são constituídos por glicoproteínas ácidas, responsáveis pela

sobrevivência, proliferação, diferenciação e maturação de células hematopoéticas além de estimular as funções da célula madura. O *multi* fator estimulante de colônias ou interleucina 3 (*multi*-CSF ou IL-3) promove o crescimento das muitas linhagens celulares. O fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) promovem a elevação do número de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos) e permitiram avanços importantes na clínica, como a aceleração da recuperação medular, causada pelo tratamento quimioterápico ou radioterápico. A eritropoetina (EPO), produzida nos rins, estimula o progenitor eritróide. As interleucinas IL-4 até IL-9, segregadas por células estromais e macrófagos ativados e as citocinas CSF (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e GM-CSF), têm algumas de suas ações influenciadas por outras citocinas tais como TNF α , TNF γ , e IFN α , que inibem a proliferação das células progenitoras na medula óssea; no entanto, IL-1¹⁶ e IL-6 promovem a ação dos CSF, na estimulação e produção de granulócitos e macrófagos envolvidos na atividade antitumoral.

A célula hematopoética normal está sob o controle de fatores estimulatórios e inibitórios da divisão celular, proporcionando a manutenção adequada do número de leucócitos e hemácias. Porém, sabe-se que o processo de replicação é sempre acompanhado do risco de ocorrência de mutações genéticas, alterações aleatórias que poderiam modificar os processos regulatórios de uma célula. A célula atingida passa a apresentar um acúmulo de lesões em seu genoma que podem provocar alterações em alguns genes altamente conservados, os proto-oncogenes; estes genes podem ser convertidos em oncogenes através de mutação de ponto, deleção, translocação cromossômica ou pela inserção de um elemento genético móvel como um DNA de origem retroviral¹⁷.

A **leucemogênese** é o processo patogênico que leva ao desenvolvimento da leucemia, uma neoplasia de proliferação clonal que representa sempre, a progênie de uma única célula^{18,19}. O processo caracteriza-se por uma proliferação neoplásica de determinada célula progenitora. A célula torna-se assim insensível a estímulos

regulatórios, dando origem a um clone com capacidade de replicação incontrolável, levando a um acúmulo exagerado de células desnecessárias as quais têm alterações profundas na capacidade de gerar uma progênie funcional^{20,21}. Esta transformação maligna pode ocorrer em qualquer momento ou em qualquer uma das rotas de diferenciação da célula hematopoética²². A leucemogênese está relacionada, em parte, com fatores ambientais, herança e fatores ambientais específicos.

As **leucemias** são um grupo de neoplasias bastante heterogêneas biologicamente, apesar de apresentarem características clínicas semelhantes entre si. A origem a partir de linhagens celulares diferentes resulta em comportamento biológico específico²³. Anormalidades citogenéticas específicas estão relacionadas ou mesmo associadas a subtipos definidos de leucemias; a detecção de uma anormalidade específica é extremamente útil no diagnóstico e contribui para a melhor compreensão de sua patogenia. Com anticorpos monoclonais específicos se reconhecem os marcadores de superfície dos diferentes leucócitos, identificando-se assim a linhagem e o ponto de diferenciação das células leucêmicas, permitindo o diagnóstico e tratamento das diferentes leucemias²⁴.

Dependendo da linhagem e do momento da diferenciação no qual determinada célula hematopoética sofre transformação neoplásica, as leucemias serão **linfóides** ou **mielóides** e **agudas** ou **crônicas**, sendo que existem inúmeros subtipos, cada um com sua história natural e resposta terapêutica características⁷.

A leucemia será **linfóide** ou **mielóide crônica** quando as células maduras com graus variados de defeitos funcionais se infiltram e acumulam por todo o organismo; tem um curso lento de progressão até o surgimento da fase avançada, quando interfere no funcionamento dos órgãos e leva o indivíduo à morte. A leucemia será **linfóide** ou **mielóide aguda** quando o evento leucemogênico der origem a uma célula nova (blastos) com uma capacidade limitada de amadurecer ou mesmo causar um bloqueio completo na sua diferenciação. Desta forma, a proliferação do clone imaturo não funcional acaba inibindo e/ou substituindo o tecido hematopoético normal e a ausência de efetores

imunes, hemácias e plaquetas causa a morte do indivíduo antes que ocorra infiltração expressiva dos demais órgãos.

REVISÃO DA LITERATURA

Leucemia mielóide crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) foi reconhecida há 150 anos, e corresponde a aproximadamente 20% das leucemias. Tem uma frequência de 1 a 2 casos por cada 100,000 pessoas por ano, afetando ambos sexos mas com incidência mais alta em homens (razão de 1.5:1) e atingindo a população adulta entre 40 a 60 anos de idade com maior frequência. A LMC foi a primeira doença humana na qual uma anomalia cromossômica específica foi associada a uma neoplasia: o cromossomo Philadelphia (Ph)^{25,26,27}.

A LMC é uma doença mieloproliferativa devido à expansão clonal de uma célula pluripotente precursora das células mielóides, eritróides, megacariocíticas, células B e linfócitos T^{28,29}. Os sinais e sintomas da fase inicial da doença geralmente desenvolvem-se insidiosamente e incluem cansaço, fadiga, baixa de peso corporal, dor abdominal, aumento do baço, anemia, leucocitose, púrpura e trombocitose. A contagem de glóbulos brancos pode atingir $200 \times 10^9/l$ e geralmente consistem de células mielóides em diferentes estágios de maturação, embora as células maduras predominem.

A doença tem um curso bi ou tri-fásico; a primeira fase, de curso indolente e denominada **fase crônica**, onde mais de 85% dos casos são diagnosticados por testes de rotina, dura em média três anos³⁰, enquanto a segunda fase, conhecida como **fase acelerada**, dura aproximadamente um ano. A terceira fase, dita **blástica ou aguda**, é definida pela presença de 30% ou mais de blastos no sangue periférico e medula ou a presença de células blásticas extra-medulares^{31,32}; embora mais frequentemente da serie mielóide, ocasionalmente os blastos são da serie linfóide^{25,33}. Esta fase pode levar à morte em 3 a 6 meses. Vinte a 25% dos pacientes falecem de complicações durante a fase acelerada, enquanto outros 20 a 25% desenvolvem a fase blástica sem passar pela acelerada³¹.

Tratamento da LMC

As diferentes alternativas de tratamento visam a erradicação do clone maligno, sendo utilizados:

1- Agentes quimioterápicos. Drogas citotóxicas, em doses elevadas, atuam indiscriminadamente sobre todas as células em divisão. Entre eles temos a hidroxiuréia, capaz de inibir a incorporação da timina dentro do DNA, controlando o nível de células sanguíneas brancas e plaquetas e proporcionando uma qualidade de sobrevivência melhor e com menos efeitos adversos severos³⁴; o bussulfan, relacionado com mielosupressão prolongada e ocasionalmente, fibrose pulmonar; e a citarabina (Ara C) que é um anti-metabólico que inibe a síntese de DNA. Estes eram os únicos agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento de LMC até há alguns anos, e parecem não alterar a sobrevida nem a progressão inexorável da doença. Atualmente estas drogas estão sendo testadas como acompanhamento do IFN- α ^{35,36}, comparando-se sua atividade com a do imatinibe³⁷.

2- Inteferon-alfa (IFN- α). Os interferons são glicoproteínas que inibem a proliferação celular e bloqueiam a transição de algumas células da fase G₀ do ciclo celular para o estado proliferativo. Agem como moduladores da diferenciação celular, podendo reverter o fenótipo maligno de células tumorais *in vitro*³⁸ e diminuindo a tumorigenicidade *in vivo*, através da diminuição da expressão oncogênica .

A terapia com IFN- α , sozinho ou em combinação com outros agentes quimioterápicos de ação anti-LMC comprovada, induz remissão hematológica em 70 a 80% dos casos em pacientes na fase crônica. Destes, 40 a 60% são acompanhados de resposta citogenética. Trinta a 40% destas respostas são expressivas (com redução da presença do cromossomo Ph a menos de 35% das metáfases). Em um estudo representativo, 20 a 25% dos pacientes em fase crônica inicial e baixo volume tumoral no

início da terapia, estavam vivos e em remissão hematológica contínua após 6 anos de tratamento com IFN- α , podendo atingir remissões citogenéticas prolongadas³⁹.

A combinação IFN- α e AraC induz uma porcentagem superior de resposta citogenética que IFN- α apenas, mas não é observada uma diferença significativa na sobrevida dos pacientes³⁵. Em um estudo randomizado, com 114 pacientes recentemente diagnosticados com LMC e num período médio de acompanhamento de 36 meses, foram comparados dois grupos: IFN- α complementado com baixas doses de Ara C ou com baixas doses de HU. A resposta citogenética maior foi de 25 e 27%, e a probabilidade de sobrevivência em 4 anos foi de 62 e 63%, respectivamente, sugerindo uma equivalência de ambas as combinações de tratamento³⁶.

No momento, o mecanismo de ação do IFN- α é alvo de intenso debate. A questão mais controversa é se IFN- α tem um efeito direto, anti-proliferativo, nas células leucêmicas (CFU-GM)⁴⁰, se age indiretamente pela ativação de efetores imunes, ou ambos. Resultados obtidos por de Castro *et al.* (2003)⁴¹ indicam que o tratamento com IFN- α em pacientes de LMC na fase crônica reduz o número de células CD34+, aumentando marcadores apoptóticos das células tronco, e ativa células T com incremento da produção de IFN- γ e IL-2 nos linfócitos.

3- Mesilato de imatinibe (STI571, Glivec). Um derivado da 2-fenil-aminopirimidina e inibidor seletivo da BCR/ABL tirosina quinase, o STI571 induz a remissão hematológica e citogenética na LMC⁴². Foi aprovado após fase I e II nos doentes na fase blástica e fase crônica resistentes ou intoleráveis ao IFN- α e designado como uma atrativa estratégia terapêutica, disponível como tratamento a partir de 1998. A série de moléculas fenilaminopirimidina sintetizadas levou a identificar CGP57 148B, uma molécula que ocupa o sítio da quinase da proteína BCR/ABL, bloqueando o acesso do ATP e prevenindo a fosforilação de qualquer substrato. Esta molécula é um inibidor importante da atividade da tirosina quinase do ABL, c-kit (fator receptor da célula tronco) e receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas⁴³.

Muitas publicações recentes estão fornecendo respostas às inúmeras perguntas que surgem quando um novo medicamento como o imatinibe é liberado. Quando o período de seguimento dos doentes de LMC tratados com STI571 era curto para se concluir sobre a capacidade deste medicamento em prolongar a sobrevida, muitas perguntas ficavam sem resposta, tais como: qual a duração da resposta ao imatinibe? Naqueles casos de doentes que alcançam respostas citogenética e molecular completas, por quanto tempo o imatinibe deverá ser mantido? Quais são os possíveis efeitos tardios deste medicamento? É efetivo nos pacientes recém diagnosticados ou é prejudicado quando precisa-se de algum outro esquema terapêutico, como IFN- α ? O tratamento prévio com imatinibe melhora ou prejudica os resultados de transplante de medula óssea alogênico? Pode o imatinibe induzir remissão molecular prolongada? Ou simplesmente, os pacientes com LMC podem ser curados pelo imatinibe?^{43,44,45}.

Outros estudos têm demonstrado os mecanismos de resistência da célula leucêmica ao mesilato de imatinibe⁴⁶. Quanto à toxicidade do imatinibe alguns relatos são feitos, tais como manifestações graves de edema cerebral, dermatite esfoliativa e urticária grave. Já o exame de medula óssea destes doentes, que exibem 50% ou menos de celularidade, mostra uma maior probabilidade de resposta citogenética ao imatinibe. Porém esta resposta não é associada à aplasia medular e sim à normalização da relação mielóide/eritróide, hiperplasia eritróide relativa, redução do número e normalização morfológica dos megacariócitos. Esses achados no exame de medula óssea ocorrem independentemente da resposta citogenética ao imatinibe, parecendo que o medicamento atua na diferenciação das células precursoras e leva a células Philadelphia positivas a exibir padrões da hematopoese normal (Fig. 2).

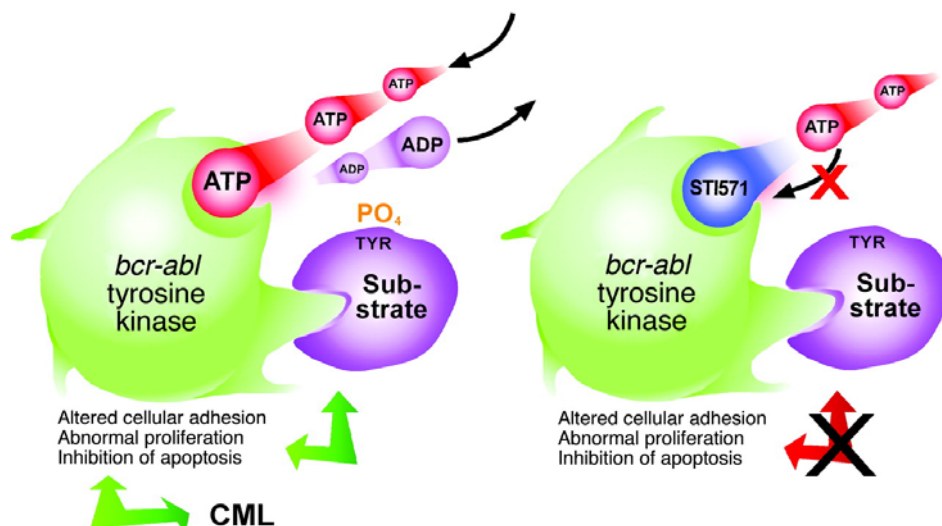


Fig. 2. Mecanismo de ação do STI571. A tirosina quinase BCR/ABL é constituída por uma quinase ativa que liga-se a ATP e transfere fosfatos da ATP para resíduos de tirosinas em vários substratos. O excesso de proliferação de células mielóides caracteriza a LMC. STI571 funciona bloqueando a ligação do ATP com a tirosina quinase BCR/ABL, inibindo sua atividade. Na ausência da atividade da tirosina quinase o substrato requerido para a função do BCR/ABL não pode ser fosforilado e subseqüentes eventos celulares são abolidos. Modificado de Mauro & Druker (2001)⁴⁷.

Os últimos resultados do estudo internacional randomizado de IFN- α e STI571 (IRIS)³⁷ comparam a eficácia de imatinibe (STI571) com INF- α mais AraC em pacientes recém diagnosticados com LMC. Participaram 1106 pacientes, recebendo STI571 (553) e IFN- α mais AraC (553), com um acompanhamento médio de 19 meses. Foi encontrada uma resposta citogenética mais freqüente no grupo de imatinibe (81%) comparada ao outro grupo (35%), com uma freqüência estimada de resposta citogenética completa de 76% e 15%, respectivamente. Aos 18 meses, a freqüência estimada de pacientes estabilizados na fase crônica foi de 97% no grupo de STI571 e de 92% no outro grupo. Além destes resultados, a maior tolerância no grupo de imatinibe leva a concluir que em termos de resposta hematológica e citogenéticas, tolerabilidade e probabilidade de progressão da doença para fase acelerada ou crises blástica na LMC, o imatinibe foi superior ao INF- α complementado com baixas doses de citarabine. O estudo sugere assim que o imatinibe vai ser adotado como primeira linha de tratamento em pacientes com diagnóstico recente de LMC na fase crônica³⁷.

4- Transplante de medula óssea (TMO). Denomina-se assim ao procedimento terapêutico onde é realizada a infusão venosa de células tronco do tecido hematopoético, com a finalidade de restabelecimento da hematopoese e erradicação da doença residual mínima (DRM). As fontes para obter HSCs são medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão umbilical. O tratamento com TMO pode ser autólogo, onde não existe doador e são utilizadas células provenientes do próprio paciente; alogênico, onde o doador apresenta compatibilidade com o receptor em termos de HLA; ou singênico quando o transplante é realizado entre irmãos gêmeos.

O TMO autólogo, tanto de células tronco da medula óssea quanto obtidas do sangue periférico, pode prolongar a sobrevivência de pacientes na fase crônica da LMC^{18,48}. No entanto, a reinfusão de células tumorais clonogênicas contidas no enxerto⁴⁹, associada à ausência do efeito enxerto-contra-leucemia (ECL)⁵⁰, pode ser o fator determinante para a alta taxa de recidiva observada no auto-transplante.

O TMO alogênico, por outro lado, pode ser curativo para pacientes jovens, transplantados precocemente no curso de sua doença⁵¹. É importante a compatibilidade nos locos A, B e DR do sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) entre o doador e receptor. O TMO também depende da idade, sendo assim oferecido somente a um número limitado de pacientes.

O efeito enxerto-contra-hospedeiro (DECH) depende da compatibilidade genética entre o doador e receptor e o efeito enxerto contra leucemia da natureza antigênica das células alvo neoplásicas. Os princípios básicos necessários para a existência da DECH são: o tecido transplantado deve conter células imunocompetentes, o receptor deve expressar antígenos ausentes no doador, e o receptor não pode ser capaz de rejeitar as células transplantadas, ou seja, o hospedeiro tem de ser imunoincompetente. Três tipos de células podem mediar o efeito enxerto contra o tumor: linfócitos T CD8⁺, que reconhecem antígenos tumorais expressos no contexto de HLA de classe I; linfócitos T CD4⁺, que reconhecem antígenos tumorais expressos no contexto de HLA de classe II; e as células NK ou *lymphokine activated killer cells* (LAK), que quando não reconhecem os

antígenos da classe I são capazes de secretar citocinas e lisar a célula alvo. A célula mais importante para mediar a ação do enxerto contra o tumor, provavelmente, depende da expressão antigênica de cada célula tumoral. O efeito enxerto-contra-hospedeiro parece ter um papel preponderante no potencial de cura do transplante alogênico em LMC^{52,53}. A morbidade e mortalidade associadas a DECH após os transplantes alogênicos estão sempre em contraposição à recidiva da doença de base. Se as células efetoras responsáveis pela DECH e pelo efeito do enxerto contra o tumor forem distintas, é possível que possa ser oferecido aos pacientes o benefício dos transplantes alogênicos, sem a DECH. Já foram descritos vários pacientes submetidos à infusão de leucócitos do doador que apresentam efeito de enxerto contra o tumor sem DECH clínica⁵⁴. Isto indica que o desencadeamento destes dois processos não é obrigatoriamente simultâneo, ainda que a mesma população de células efetoras possa estar envolvida nos dois processos. Baseados nestas observações, vários ensaios clínicos foram delineados para explorar o efeito anti-leucemia da doença enxerto-contra-hospedeiro (DECH). Um deles propõe que o efeito do enxerto contra o tumor possa ser desencadeado por um número de leucócitos inferior ao necessário para desencadear a DECH, permitindo separá-los através da administração de doses escalonadas de leucócitos⁵⁵.

Os genes c-ABL e BCR

O gene c-ABL está localizado perto da extremidade do braço longo do cromossomo 9 homólogo ao proto-oncogene do vírus Abelson da leucemia murina (*v-abl*)^{61,56}, orientado de forma que a extremidade 5' do gene é dirigida para o centrômero. Estende-se numa distância de 300 kb e a seqüência que codifica a tirosinoquinase está localizada na extremidade 3' do gene⁶² (Fig. 3).

O gene c-ABL tem dois possíveis primeiros exons, localizados a 15 kb e a mais de 100 kb, respectivamente, da extremidade 5' do exon 2 (exon comum). Quando a transcrição começa no exon 1b, o exon 1a é retirado e o exon 1b é fusionado ao exon 2

durante o processamento do RNA, de forma que existem dois possíveis mRNAs. Estes dois mRNAs, de 6 e 7 kb, são traduzidos em proteínas que diferem por 19 aminoácidos na extremidade aminoterminal.

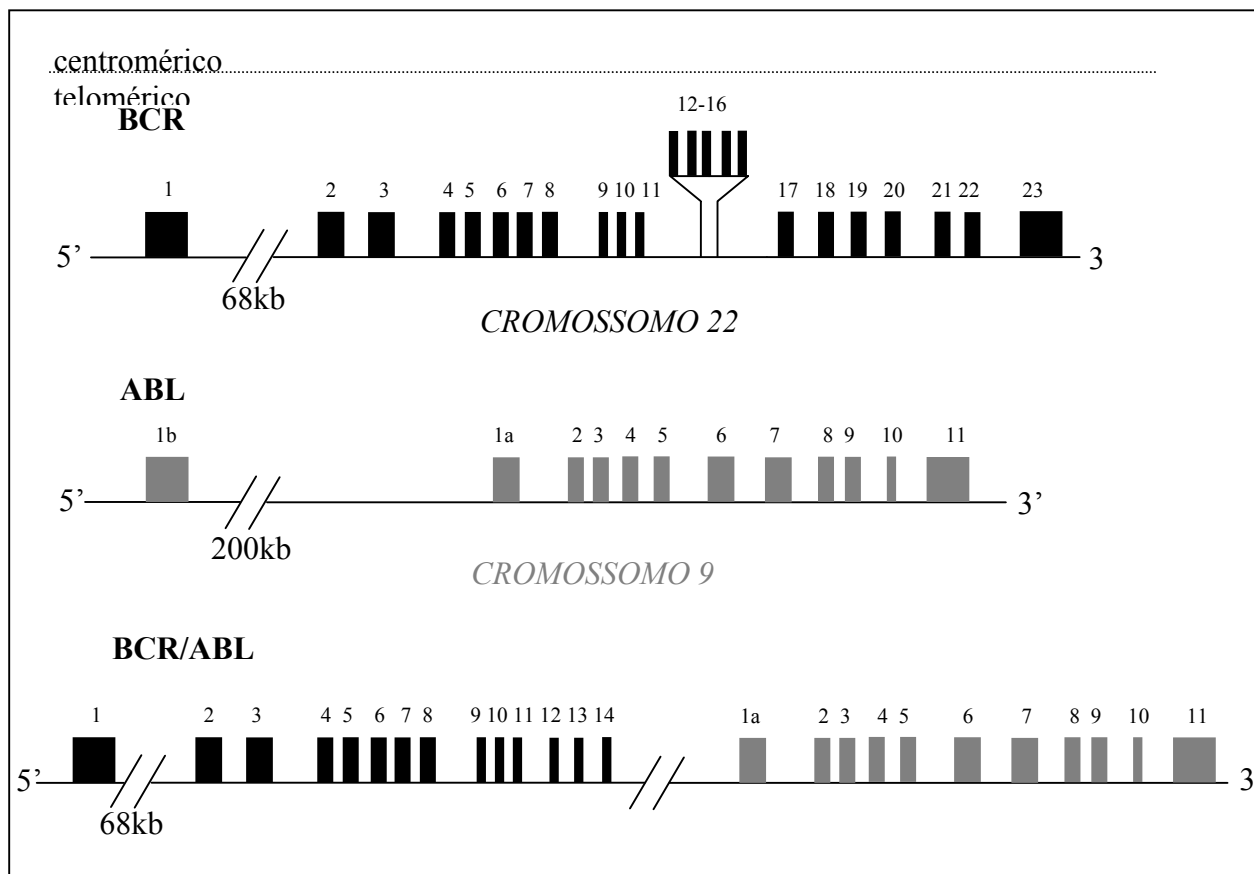


Fig. 3 - Representação esquemática dos genes ABL, BCR e BCR-ABL. Os exons são mostrados como retângulos claros para o ABL e escuros para o BCR.

A proteína ABL normal apresenta atividade de tirosinoquinase e pertence a uma família de proto-oncogenes da qual SCR é o protótipo. A expressão em altos níveis do gene não resulta em transformação maligna, mas interrompe o ciclo celular⁶³, sugerindo assim um papel regulatório negativo do ABL no crescimento celular. O mRNA é encontrado em níveis elevados no baço, timo e testículos. A proteína ABL localiza-se no núcleo mas também pode ser encontrada no citoplasma quando expressa em quantidades maiores.

Análises dos cDNAs de seqüências do c-ABL do homem indicam que a proteína apresenta domínios estruturais altamente conservados. Estes domínios incluem a

presença de um sítio de miristilação na extremidade aminoterminal, domínios com homologia a SRC, SH2 e SH3, um domínio com atividade de tirosinoquinase (SH1), um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ligação a actina.

O BCR, ou região de agrupamento de pontos de quebra (*breakpoint cluster region*), é identificado numa região no cromossomo 22, com uma amplitude de 135 kb que inclui 23 exons (Fig. 3). A expressão do gene origina 2 tipos de mRNA, de 4,5 e 6,7 kb, traduzidos em uma proteína de 160 kb⁶⁴. Esta proteína apresenta atividade de auto e transfosforilação para vários substratos protéicos *in vitro*. O domínio associado com atividade serina/serotonina quinase é codificado por um único exon, o exon 1 do BCR, onde também se encontra uma região de ligação com domínio SH2, envolvido na regulação de quinases e com capacidade de interagir com o domínio SH2 do ABL. Diferentes proteínas do BCR de várias células humanas podem ser identificadas, com tamanhos de 83 a 190 kD^{65,66}. A proteína BCR está localizada no citoplasma de células que não entram no ciclo celular.

Cromossomo Philadelphia BCR/ABL (Ph)

A translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (9;22)(q34;q11) gera um cromossomo 22 encurtado (22q-, ou cromossomo Ph) e um cromossomo 9 alongado (9q+)^{56,26,27}. O cromossomo Ph é observado em 95% dos casos de LMC, 20–30% de leucemia linfoblástica aguda nos adultos (LLA) e 2–10% de LLA em crianças. Foi demonstrado que o ponto de quebra (*breakpoint*) no cromossomo 9 está localizado entre o primeiro e o segundo introns do gene *c-abl*. O ponto de quebra do cromossomo 22 (22q-) envolve 3 regiões de *clusters*, designados M-BCR (*major breakpoint cluster region*)⁵⁷, m-BCR (*minor breakpoint cluster region*) e μ -BCR (*micro breakpoint cluster region*)⁵⁸. A fusão molecular que resulta no gene híbrido humano BCR/ABL envolve a mudança da maior parte do proto-oncogene *c-abl* do cromossomo 9 para o cromossomo

22 (Fig. 4). Esta fusão dá origem a a formação de dois novos genes quiméricos: o gene BCR/ABL no cromossomo Philadelphia e o gene ABL/BCR no braço longo do cromossomo 9 (9q+). No passado foi relatado que cerca de 5% dos pacientes com LMC não apresentavam Ph em suas células leucêmicas. Agora, com a análise de DNA das células hematopoéticas, pode ser revelada a presença do gene BCR/ABL, apesar da ausência do cromossomo Ph²⁵. Estes resultados salientam a importância do gene BCR/ABL para a patogênese da LMC e identificam as LMC Ph⁻ BCR/ABL⁺ como variantes incomuns da doença, envolvendo rearranjos gênicos complexos e sem apresentar o Ph típico⁵⁹. Este marcador citogenético e/ou molecular é útil no diagnóstico da LMC e para a detecção de doença residual nos pacientes em tratamento⁶⁰.

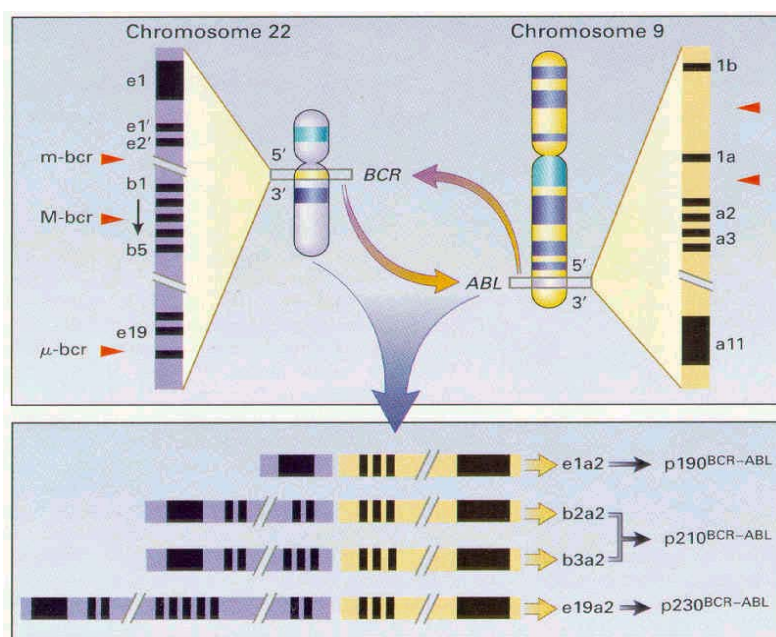


Fig. 4 - O cromossomo Philadelphia. A translocação recíproca t(9;22)(q34;q11) origina o cromossomo Philadelphia. A translocação leva à fusão de uma porção do gene BCR, localizado no cromossomo 22, com o segmento do gene ABL, no cromossomo 9. Resultando em tres diferentes proteínas de 190, 210 e 230kDa. Modificado de Faderl *et al.* (1999)³⁰.

Os mRNAs BCR/ABL

A maioria dos pontos de quebra estão localizados a 5' ou 3' do exon b3, de forma que o gene BCR/ABL quimera pode incluir ou excluir este exon, originando duas espécies distintas de mRNAs. Na molécula de 8,5 kb onde o exon b3 foi excluído, o exon b2 do BCR é justaposto ao exon 2 do ABL durante o processamento (mRNA b2a2). O gene que inclui o exon b3 produz um mRNA onde o exon b3 é justaposto ao exon 2 do ABL (mRNA b3a2) ou, por mecanismo alternativo de processamento, gera um mRNA b2a2^{67,68,69} (Fig. 5).

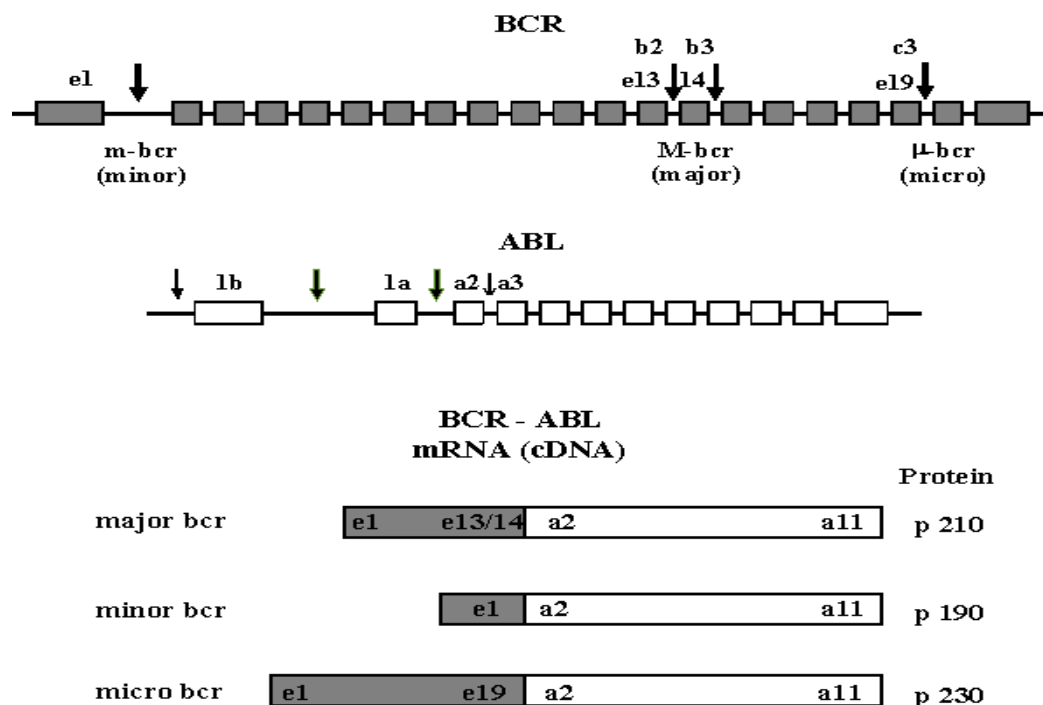


Fig. 5 - Esquema simplificado dos genes BCR e ABL indicando *major breakpoint cluster region*. Possíveis transcritos BCR/ABL e as origens das proteínas. Modificado de Haškovec & Polák (1999)⁷⁰.

Dependendo do sítio onde ocorre o ponto de quebra no gene BCR, a proteína de fusão pode variar em tamanho desde 190 kD até 230 kD. A p190^{BCR/ABL} é o produto do gene híbrido resultante da junção do primeiro exon do BCR com o gene ABL, que translocada para este ponto apresenta a atividade tirosinoquinase grandemente aumentada em relação à p210^{BCR/ABL}, o que está correlacionado com seu maior poder

transformante e sua associação com formas agudas de leucemias em vez de crônicas⁷¹. Os mecanismos de transformação induzida pelas proteínas BCR/ABL são desconhecidos. Existem evidências de que a p210^{BCR/ABL} interage através de seus domínios SH2 e SH3 com várias outras proteínas, incluindo aquelas da seqüência sinalizadora do RAS, como o GAP e RAC, a proteína BCR normal e a proteína adaptadora GRB2. Recentemente, uma proteína quimérica de 230 kD foi encontrada em um grupo de pacientes com LMC que apresentavam um número de leucócitos menor que aquele característico da doença e nos quais a progressão da crise blástica era lenta⁷².

Características das células BCR/ABL

Os efeitos biológicos do gene BCR/ABL em células LMC incluem a indução de proliferação celular, defeitos de adesão e inibição da apoptose (Fig. 6).

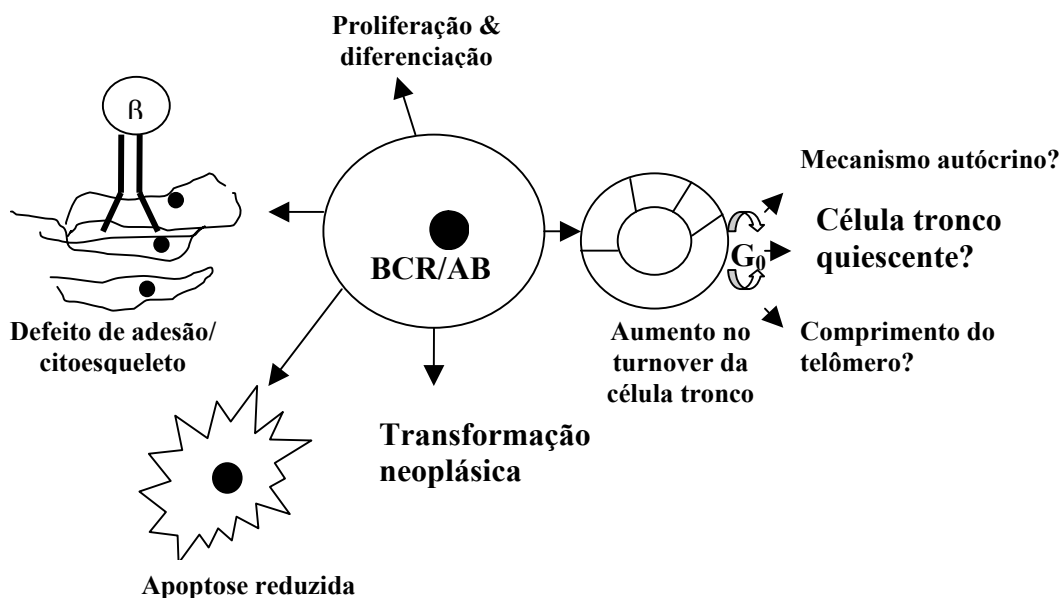


Fig. 6. Efeitos da proteína P210+ em células BCR/ABL-positivas no citoesqueleto, adesão celular, apoptose, proliferação da célula tronco e diferenciação de células troncos e progenitores da LMC. Modificado de Jorgensen & Holyoake (2001)⁷³.

Proliferação celular. O proliferação característica dos progenitores de LMC é provavelmente muito similar ao de células encontradas no compartimento normal, o que pode ser o motivo pelo qual a doença é tão difícil de ser tratada de maneira eficaz por quimioterápicos antiproliferativos. Sabe-se que as células de LMC, na fase crônica, são dependentes de fatores de crescimento, demonstrando uma resposta normal aos controles de proliferação celular⁷⁴. Além disso, provavelmente a proliferação celular não é o resultado de um mecanismo anormal autócrino ou parácrino⁷⁵.

A presença de efetores imunes benignos, de função citotóxica preservada na medula óssea de pacientes portadores de LMC, pode ser responsável pelas longas remissões observadas com o tratamento com IFN- α quando o volume tumoral é pequeno. Tais efetores imunes são passíveis de ativação, e sua correlação com o desaparecimento do clone maligno, Ph positivo, em culturas de longo termo permite prever a resposta terapêutica dos pacientes portadores de LMC ao IFN- α .

Eaves *et al.* (1986)⁴⁸ demonstraram que progenitores de LMC apresentam um aumento de entrada no ciclo celular, na presença ou ausência da camada estromal, quando comparados a células normais, sugerindo uma explicação para a contínua entrada no ciclo celular e a produção de progenitores primitivos Ph-positivos. Este mesmo grupo sugere que células leucêmicas são caracterizadas por um provável decréscimo de auto-renovação com uma probabilidade aumentada de diferenciação celular⁷⁶.

O cultivo *in vitro* de medula óssea de pacientes com LMC resulta na seleção de células normais, em detrimento das células Ph-positivas⁷⁷. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar este fenômeno. Um deles salienta uma ausência de resposta à proteína inflamatória de macrófago 1- α (MIP-1 α)⁷⁸. Outro mecanismo foi proposto pela observação de que progenitores BCR/ABL negativos têm a vantagem de crescimento sobre o clone positivo na ausência de fator de células tronco (SFC). As células CD34⁺ derivadas de LMC são induzidas numa expansão seletiva quando se acrescenta somente SFC^{79, 80}. Silla *et al.* (1995)⁸¹ propõem um papel anti-leucêmico autólogo para células NK,

que podem ser selecionados e expandidas em cultura de sangue periférico de pacientes com LMC na presença de IL-2. Examinando tais culturas foi possível observar a formação de rosetas e correlacionar a exuberância desta formação com a proliferação de células A-NK e o desaparecimento de células malignas nas culturas.

Todos estes resultados indicam que células leucêmicas possuem uma característica alterada do crescimento celular quando comparadas às normais, provavelmente por dependerem da presença de diversas moléculas estimulatórias do crescimento, as quais se unem na expansão do clone maligno *in vivo*.

Defeito de adesão. A adesão de células tronco/progenitoras ao microambiente da medula óssea é o principal fator para a regulação da hematopoese. Diferentes famílias de moléculas de adesão são mediadoras na interação célula-célula e célula-matriz extracelular, tais como integrinas, selectinas, o marcador de superfície CD44 e a família das imunoglobulinas. A interação específica entre as moléculas de adesão e seus receptores têm papel importante no *homing* e mobilização dos progenitores hematopoéticos.

Sabe-se que a adesão dos progenitores hematopoéticos normais à matriz extracelular é induzida por citocinas, responsáveis pelo crescimento celular, e mediada principalmente por integrinas, receptores da superfície celular. As integrinas são glicoproteínas compostas por duas sub-unidades: α , que determina a especificidade e β , que inicia a transdução de sinais⁸². É sugerida a existência de um defeito funcional ao invés de estrutural nas células Ph positivas, que pode estar relacionado à presença do gene rearranjado BCR/ABL. Tal defeito promoveria maior proliferação de progenitores leucêmicos que normais, mesmo que a duração do ciclo celular da célula maligna seja mais longa. Entretanto, sob condições de cultivo *in vitro*, ocorre situação inversa. Sabe-se que a célula leucêmica não sobrevive nessas condições.

Por outro lado, tem sido demonstrado que em um número significativo de pacientes com LMC as células de estroma medular possuem uma capacidade defeituosa

de suporte hematopoético, que inclui a produção anormal de citocinas solúveis. Nas culturas de longo termo (LTC), o estroma formado é defeituoso. Não é sabido ao certo se essas alterações antecedem o quadro clínico de LMC ou são uma consequência⁸³. Tal informação está em concordância com a noção de que deveria haver mais células nas culturas normais, o que estaria relacionado com o desaparecimento das células Ph positivas em cultura.

A saída prematura de células mielóides parcialmente diferenciadas da medula óssea, ou de elementos estromais para o sangue periférico, característico da LMC, incentivou o desenvolvimento de pesquisas relacionados a possíveis defeitos de adesão induzidos por BCR/ABL⁸⁴. Petzer *et al.* (1996)⁸⁵ demonstraram que não somente os progenitores de LMC estão presentes em elevado número no sangue periférico, mas que células iniciadoras de cultura de longo termo (LTCIC) Ph-negativas estão também em grande número quando comparadas com os controles, indicando que o mecanismo que causa a saída dos progenitores leucêmicos Ph-positivo pode também estar influenciando o compartimento normal. Desta forma é sugerido que a saída de células imaturas da medula óssea não somente reflete um defeito de adesão como também pode indicar uma falha funcional da célula imatura mielóide no microambiente da medula óssea. Gordon *et al.* (1987)⁴² demonstraram que células de LMC, quando comparadas a camadas normais, têm uma capacidade defeituosa de adesão, quando cultivadas para formar a camada estromal. Além disto, células leucêmicas Ph⁺Lin⁻CD34⁺HLADR⁺ mostram um decréscimo quando cultivadas na cultura contendo fibronectina⁸⁶. Quando são cultivadas células de pacientes tratados com IFN- α , observa-se além de alterações na composição da camada estromal um aumento no potencial de adesão das células leucêmicas; isto sugere o efeito clínico do IFN- α no aumento da capacidade de adesão dos progenitores da LMC e no restabelecimento de propriedades reguladoras normais da célula estromal. A restauração do defeito de citoadesão das colônias expostas ao IFN- α no cultivo *in vitro* restabelece a inibição de proliferação das CFC leucêmicas^{87,88}.

Diversas moléculas de adesão estão envolvidas na redução de adesão das células de LMC. Kawaishi *et al.* (1996)⁸⁹ demonstraram que a expressão de L-selectina encontra-se diminuída nas células CD34⁺ dos pacientes com LMC. Bhatia *et al.* (1996, 1998)^{88,90} observaram que uma alteração no funcionamento no receptor da integrina β -1 de progenitores LMC, depois que os pacientes foram tratados com IFN- α ou quando as células BCR/ABL foram expostas a oligonucleotídeos, resultou na adesão dos progenitores hematopoéticos a células estromais da medula óssea e inibição da proliferação dos progenitores de LMC. Outro possível papel da integrina β -1 sugerido por Bhatia *et al.* (1995)⁸⁷ é a produção de MIP-1 α , induzido na camada estromal após tratamento com IFN- α .

Apoptose. Muitas linhas de pesquisas salientam o papel do BCR/ABL como supressor de apoptose. Assim, Bedi *et al.* (1995)⁹¹ demonstraram que a proteína BCR/ABL confere resistência a apoptose e prolonga o ciclo celular na fase G2/M depois de induzir dano no DNA. McGahon *et al.* (1994)⁹² observaram que células progenitoras hematopoéticas que expressam p210 (BCR/ABL) são capazes de escapar da dependência dos fatores de crescimento e resistir a efeitos nocivos de drogas citotóxicas e radiação. Em outro estudo, Gordon *et al.* (1999)⁹³ apresentaram evidências sugerindo a susceptibilidade à apoptose depende do estado específico de maturação em que a célula se encontra.

JUSTIFICATIVA

A leucemia mielóide crônica (LMC) é considerada hoje em dia curável, graças ao transplante de medula óssea e apesar do grande avanço no tratamento com quimioterápicos a doença, bem como no conhecimento dos eventos moleculares associados com a patogênese da LMC, pouco é conhecido ainda sobre a relação destes com a heterogeneidade clínica observada e como estes eventos atuam determinando a evolução da doença. Resultados de estudos, tanto ao nível de DNA como de mRNA, demonstram a necessidade de uma análise detalhada não apenas da estrutura da translocação que resulta no cromossomo Ph, nos transcritos BCR/ABL e nas proteínas codificadas por estes, mas também nos efeitos do gene híbrido sobre a biologia celular.

Sabe-se que na LMC as células tronco/progenitoras hematopoéticas portadoras do gene híbrido BCR/ABL têm vantagem proliferativa sobre as células normais, que são inibidas por quimioquinas. Esta vantagem, entretanto, não se mantém no cultivo de longa duração que favorece a proliferação de células BCR/ABL negativas. Os motivos desta reversão não são ainda conhecidos, e podem representar um caminho para a melhor compreensão da biologia da célula leucêmica e o manejo da leucemia.

Neste contexto, justifica-se o estudo das células tronco hematopoéticas portadoras da translocação BCR/ABL presentes na medula óssea em diferentes momentos do desenvolvimento da doença, buscando-se compreender o significado da sobrevivência destas células durante e após o tratamento em diferentes proporções, em diferentes pacientes.

OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo geral contribuir para a caracterização biológica das células hematopoéticas e do microambiente medular na leucemia mielóide crônica. Este objetivo foi abordado através da avaliação do comportamento de células da medula óssea de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica durante o cultivo *in vitro*, analisando-se sua interação com células leucêmicas ou normais. Dois compartimentos foram investigados: o compartimento hematopoético, representado por células tronco / progenitoras CD34+; e o compartimento estromal, formado a partir do cultivo da camada de células aderentes da medula óssea.

Os objetivos específicos são resumidos a seguir:

- Avaliar a sobrevivência e proliferação de células tronco hematopoéticas BCR/ABL+ em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.
- Analisar a interação entre células tronco / progenitoras e camadas estromais derivadas de indivíduos normais ou com LMC, buscando-se avaliar condições que favoreçam a proliferação das células hematopoéticas normais. Esta questão foi abordada através do estabelecimento *in vitro* de camadas estromais normais ou leucêmicas, que foram irradiadas e utilizadas como suporte no cultivo de células CD34+ normais ou BCR/ABL-positivas. Estas foram posteriormente analisadas quanto à sua frequência e capacidade clonogênica.
- Avaliar o papel de outros componentes celulares da medula óssea sobre o comportamento das células tronco / progenitoras BCR/ABL-positivas durante o cultivo *in vitro*. Para responder a esta questão, células CD34+ coletadas da medula óssea de pacientes com LMC foram cultivadas como parte da fração mononuclear ou após isolamento em colunas magnéticas, analisando-se sua manutenção através de ensaio clonogênico e frequência de colônias BCR/ABL-positivas, determinada por RT-PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Metcalf D. The Molecular Control of Blood Cells. Harvard University Press, 1988. p165.
2. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81: 2844-53.
3. Emerson SG. The Stem Cell Model of Hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ (eds) Hematology - Basic Principles and Practice Churchill Livingstone New York 1991; p 71-81.
4. Hatzfeld J, Wagner JE, Okarma TB, O'Reilly RJ. Bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 1992; 29, s1: 2-32.
5. Bernstein I, Milner L, Andrews R, Rowley S, Kopan R, Martin D. Stem cells in human hematopoiesis. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: s3-s4.
6. Ratajczak MZ & Gewirtz AM. The biology of hematopoietic stem cells. *Semin Oncol* 1995; 22 (3): 210-7.
7. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ. Hematology Basic Principles and Practice. New York: Churchill Livingstone. 2 ed. 1995.
8. Silla LMR, Pincus SM, Locker JD, *et al.* Generation of activated natural killer (A-NK) cells in patients with chronic myelogenous leukaemia and their role in the *in vitro* disappearance of BCR/abl-positive targets. *Brit J Haematol* 1996; 93: 375-85.
9. Martin PJ, Wuming the battle of graft versus host. *Nat Med* 1999; 6(1) : 18 -29 .
10. Wineman J, Moore K, Lemischka I, Müller-Sieburg C. Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cell. *Blood* 1996; 87: 4082-90.
11. Nakahata T, Gross AJ, Otawa M. Stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of the primitive hematopoietic stem cells in culture. *J Cell Physiol* 1982; 113: 455-8.

12. Novak JP & Stewart CC. Stochastic versus deterministic in hematopoiesis: What is what?. *Br J Haematol* 1991; 78: 149-54.
13. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105 -11.
14. Tabbara IA & Robinson BE. Hematopoietic growth factor. *Anticancer Res* 1991; 11: 81-90.
15. Minden M. Growth factor requirements for normal and leukemic cells. *Semin Hematol* 1995; 32: 162-82.
16. Estrov Z, Zurzrock R, Wetzler M, *et al.* Suppression of chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors: a novel application for inhibitors of IL-1 activity. *Blood* 1991;78:1476-84.
17. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, Inc. 3th ed. 1994.
18. Butturini A, Keating A, Goldman JM, Gale RP. Autotransplants in chronic myelogenous leukemia: strategies and results. *Lancet* 1990; 335: 1255-8.
19. Raskind WH & Fiakow PJ. The use of cell markers in the study of human hematopoietic neoplasia. *Adv Cancer Res* 1987 63: 93-8.
20. Hugles T & Goldman J. Chronic Lymphocytic Leukemia. In Hoffman R; Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H (eds.). *Hematology - Basic Principles and Practice*. Churchill Livingstone. New York. 1991; p 854-69.
21. Rai KR, Chronic lymphocytic leukemia. In Hoffman R; Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H (eds.). *Hematology - Basic Principles and Practice*. Churchill Livingstone. New York.1991: 990-1001.
22. Lorenzi T. Leucemogênese - Revisão. *Inform.Cient. Fundação Maria Cecília Souto Vidigal*, 1992; fev-mar: 07-24.
23. Oliveira M, Quintana I, Lamosa A. Leucemias e marcadores celulares. *Oncol Anual* 1992; 2: 237-44.
24. Nardi NB & Onsten T. Monoclonais contra leucemia. *Ciência Hoje* 1988; 7: 29-34.

25. Barnett M & Eaves C. Chronic myeloid leukemia. In: Henderson E, Lister T, Greaves M. *Leukemia Philadelphia: W B Saunders Company* 6ed. 1996. Cap25: 535-53.
26. Nowell PC & Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497-99.
27. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-3.
28. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, eritrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* 1977; 63: 125-30.
29. Martin PJ, Najfeld V, Hansen JA. Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1980; 287: 49-53.
30. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. Mechanisms of disease: The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341(3): 164 - 72.
31. Kantarjian H, Dixon D, Keating MJ, *et al.* Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1988; 61: 1441-6.
32. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 340: 1330-40.
33. Sandberg A. Chromosome Changes in Leukemia and Cancer and Their Molecular Limning. In: Kirsch IR. *The Causes and Consequences of Chromosomal Aberrations*. Boca Raton: CRC Press. 1993; Cap 6, p141-63.
34. Hehlmann R, Hochhaus A, Kolb HJ, *et al.* Interferon-alpha before allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia does not affect outcome
35. Baccarini M, Rosti G, de Vivo A, *et al.* A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99: 1527-35.

36. Kühr T, Burgstaller S, Apfelbeck, *et al.* A randomized study comparing interferon (IFN α) plus low-dose cytarabine and interferon plus hydroxyurea (HU) in early chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML). *Leuk Res* 2003; 27: 405-411.
37. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348(11): 994-1004.
38. Cornelissen JJ, Ploemacher RE, Wognum BW, *et al.* An *in vitro* model for cytogenetic conversion in CML: interferon-(alpha) preferentially inhibits the outgrowth of malignant stem cells preserved in long-term culture. *J Clin Invest* 1998; 102: 976-83.
39. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: A concise update. *Blood* 1993; 82: 691-703.
40. Gordon MY, Marley SB, Lewis JL, *et al.* Treatment with interferon-(alpha) preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) from patients with chronic myeloid leukemia but spares normal CFU-GM. *J Clin Invest* 1998; 102: 710-5.
41. De Castro FA, Palma BPV, Morais FR, *et al.* Immunological effects of Interferon-alpha on chronic myelogenous leukaemia. 2003 (no prelo).
42. Eaves CJ, Barnett MJ, Eaves AC. *In vitro* culture of bone marrow cells for autografting in LMC. *Leukemia* 1993; 7 s2: 126-29.
43. Goldman JM & Melo JV. Targeting the BCR/ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. [editorial]. *N Engl J Med* 2001; 344(3): 1084-6.
44. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR/ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344 (14): 1031-7.
45. Savage DG & Antman, KH. Imatinib mesylate: a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 2002; 346 (9): 683-93.
46. Luzzato L & Melo, JV. Acquired resistance to imatinib mesylate: selection por pre-exis mutant cells [letter]. *Blood* 2002; 100(3): 1105 - 06.

47. Mauro MJ & Druker BJ. STI571: Targeting BCR/ABL as therapy for CML. *The Oncologist* 2001; 6: 233-6.
48. Eaves AC, Cashman JD, Gaboury LA, Kalousek DK, Eaves CJ. Unregulated proliferation of primitive chronic myeloid leukemia progenitor in the presence of normal marrow adhered cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5306-10.
49. Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D, *et al.* Genetic marking shows that Ph cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in LMC. *Blood* 1994; 83: 3068-76.
50. Ringden O & Horowitz M; for the Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. Graft-versus-host leukemia reactions in humans. *Transplant Proc* 1989; 21: 2989-92.
51. Clift RA, Appelbaum FR, Tomas ED. Treatment of chronic myeloid leukemia by marrow transplantation. *Blood* 1993; 82: 1954-6.
52. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 555-62.
53. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, *et al.* Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic marrow grafts. *N Engl J Med* 1979; 300: 1068-73.
54. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, *et al.* Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood* 1993; 82 (2): 398-407.
55. Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC, *et al.* Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96(8) : 2712-16.
56. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in CML. *Nature* 1983; 306: 765-7.
57. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcripts of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985; 315: 550-54.

58. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984; 36: 93-9.
59. Calabrese G, Stuppia L, Guanciali F, *et al.* Complex translocations of the Ph chromosome and Ph negative CML arise from similar mechanisms, as evidenced by FISH analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 78: 153-9.
60. Morgan GJ, Wiedemann LM, Chan LC, Price CM, Kanfer EJ, Galton DA. A case of M-BCR-rearranged, Philadelphia-positive AML that relapsed as chronic phase CML. *Blood* 1990; 75 (1): 317-8.
61. Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res* 1970; 30: 2213-20.
62. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Rae BA, Canaani E. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the BCR/ABL fused gene. *Cell* 1986; 47: 277-84.
63. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 1994; 77: 121-31.
64. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph translocation. *Nature* 1985; 315: 758-61.
65. Collins S, Coleman H, Groudine M. Expression of bcr and BCR/ABL fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol* 1987; 7 (8): 2870-6.
66. Li WJ, Smith LA, Kabat KG, Kloetzer WS, Arlinghaus RB. Differential effects of tumor promoters on P210BCR/ABL expression. *Hematol Pathol* 1989; 3(3): 113-23
67. Mills KI, Stewart J, Burnett AK. Correlation of M-bcr breakpoint with different chromosomal abnormalities in blast crisis Ph-positive CML. *Leuk Res* 1991; 15 (11): 999-1003.
68. Morgan GJ & Wiedemann LM. The clinical application of molecular techniques in Philadelphia-positive leukaemia. *Br J Haemat* 1992; 80: 1-5.

69. Nakamura K, Miyashita T, Ozaki M, *et al.* Molecular studies of chronic myelogenous leukemia using the polymerase chain reaction. *Cancer* 1991; 68 (11): 2426-30.
70. Haškovec C & Polák J. Molecular Diagnosis of Philadelphia-positive Leukemias. In: *Molecular Biology of Hematopoiesis 6.* (Ed. N.G. Abraham) Plenum Publish. Comp 1999; p 77-82.
71. Lugo TG, Pendergast A-M, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of BCR/ABL oncogene products. *Science* 1990; 247: 1079-82.
72. Pane F, Frigeri F, Sindona M, *et al.* Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 1996; 88 (7): 2410-4.
73. Jorgensen HG & Holyoake TL. A comparison of normal and leukemic stem cell biology in chronic myeloid leukaemia. *Hematol Oncol* 2001; 19: 89-106.
74. Gishizky ML & Witte ON. Initiation of deregulated growth of multipotent progenitor cells by BCR/ABL *in vitro*. *Science* 1992; 256: 836-9.
75. Otsuka T, Eaves CJ, Humphries RK, Hogge DE, Eaves AC. Lack of evidence for abnormal autocrine or paracrine mechanisms underlying the uncontrolled proliferation of primitive chronic myeloid leukaemia progenitor cells. *Leukemia* 1991; 5: 861-8.
76. Petzer AL, Eaves CJ, Barnett MJ, Eaves AC. Selective expansion of primitive normal hematopoietic cells in cytokine-supplemented cultures of purified cells of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1997; 90: 64-9.
77. Ferrero D, Foli C, Giaretta F, Argentino C, Rus C, Pileri A. Growth advantage of chronic myeloid leukemia CFU-GM *in vitro*: survival to growth factor deprivation, possibly related to autocrine stimulation, is a more common feature than hypersensitivity to GM-CSF/IL3 and is efficiently counteracted by retinoids +/- alpha-interferon. *Leukemia*. 2001; 15: 422-9.
78. Eaves CJ, Cashman JD, Wolpe SD, Eaves AC. Unresponsiveness of primitive chronic myeloid leukemia cells to macrophage inflammatory protein 1 alpha, an

- inhibitor of primitive normal hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 12015-9.
79. Brown RD, Yuen E, Kronenberg H, Rickard KA. Stimulation of persisting colonies in agar cultures by sera from patients with CML and AML. *Blood* 1986; 68: 37-40.
80. Moore S, Haylock DN, Levesque J, *et al.* Stem cell factor as a single agent induces selective proliferation of the Philadelphia chromosome positive fraction of chronic myeloid leukemia CD34+ cells. *Blood* 1998; 92: 2461-70.
81. Silla LMR, Whiteside TL, Ball ED. The role of natural killer cells in the treatment of chronic myeloid leukemia. *J Hematother* 1995; 4: 269-79.
82. Verfaillie CM, Hurley R, Zhao RCH, Prosper F, Delforge M, Bhatia R. Pathophysiology of CML; do defects in integrin function contribute to the premature circulation and massive expansion of the BCR/ABL positive clone?. *J Lab Clin Med* 1997; 129: 584-91.
83. Mayani H. Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1041-47.
84. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of hematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 1987; 328: 342-4.
85. Petzer AL, Eaves CJ, Lansdorp PM, Ponchio L, Barnett MJ, Eaves AC. Characterization of primitive subpopulations of normal and leukemic cells present in the blood of patients with newly diagnosed as well as chronic myeloid leukemia. *Blood* 1996; 90: 2162-71.
86. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitor in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *J Clin Invest* 1992; 90: 1232-41.
87. Bhatia R, McCarthy JB, Verfaillie CM. Treatment of marrow stroma with interferon-alpha restores normal beta1 integrin-dependent adhesion of chronic myelogenous

- leukemia hematopoietic progenitor. Role of MIP-1 alpha. *J Clin Invest* 1995; 96: 931-9.
88. Bhatia R, McCarthy JB, Verfaillie CM. Interferon- α restores normal (β)1 integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by the marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1996; 87: 3883-91.
 89. Kawaishi K, Kimura A, Katoh O, *et al.* Decreased L-selectin expression in CD34-positive cells from patients with chronic myelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 93: 367-74.
 90. Bhatia R & Verfaillie CM. Inhibition of BCR/ABL expression with antisense oligodeoxynucleotides restores β -1 integrin-mediated adhesion and proliferation inhibition in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Blood* 1998; 91: 3414-22.
 91. Bedi A, Barber JP, Bedi GC, *et al.* BCR/ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage – a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 1995; 86: 1148-58.
 92. McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, Cotter KM, Green DR, Cotter TC. BCR/ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 1994; 83: 1179-87.
 93. Gordon MY, Dazzi F, Marley SB, *et al.* Cell biology of CML cells. *Leukemia* 1999; 13 s1: s65-s71.

**Interaction between normal and CML hematopoietic progenitors and stroma during
in vitro culture.**

Elvira Alicia Aparicio Cordero¹, Lúcia Mariano da Rocha Silla¹, Andrés Delgado Cañedo²,
Waldir Francisco Allebrandt³, Laura Fogliatto¹, Nance Beyer Nardi²

¹ Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; ² Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ³ Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil

Research supported by: FAPERGS, CAPES, FIPE (HCPA).

Keyword: chronic myeloid leukemia, BCR/ABL, *in vitro* culture, CD34+ cell, marrow stromal, support hematopoietic, clonogenic assay

Correspondence to: Nance Beyer Nardi

Departamento de Genética, UFRGS
Caixa Postal 15053, 91501-900, Porto Alegre RS, Brasil
Phone number: +55 (51) 33166740
FAX number: +55 (51) 33167311
e-mail: nardi@ufrgs.br

Total text word count: 1196 words

Abstract word count: 143 words

Chosen scientific heading: Neoplasia

Short title: Culture of normal and CML progenitors and stroma.

Submetido a Stem Cells

Abstract

Several studies have shown defective progenitor-stromal interactions in chronic myeloid leukemia (CML), and adhesive defects induced by BCR/ABL have been described, although controversial results have been reported. In this study, we examined the interaction of normal or CML hematopoietic and irradiated stromal cells, co-cultured in different combinations for 10 or 21 days. Maintenance of viable cells was dependent both on the sources of hematopoietic progenitors and stromal adherent layers, with normal cells performing better than their leukemic counterparts. The frequency of CD34⁺CD38⁻ cells in the non-adherent fraction was more related to the source of hematopoietic cells than of stroma, and hematopoietic cells from normal subjects showed better performance. The simultaneous analysis of different combinations of normal and leukemic precursor cells and stromal layers, as done in the present work, suggests that the outcome of the interaction depends on characteristics of both compartments.

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant clonal disorder of the hematopoietic stem cells resulting in myeloid hyperplasia in the bone marrow as well as an increase of myeloid and erythroid cells and platelets in peripheral blood. One of the characteristics of the hematopoietic differentiation affected by the expression of BCR/ABL is the interaction between hematopoietic cells and the marrow stroma¹. To obtain sustained hematopoiesis, primitive hematopoietic cells must interact with an adequate microenvironment. The stromal compartment includes among others macrophages, fibroblasts, adipocytes, and endothelial cells², and plays an active role in hematopoiesis by producing extracellular matrix (ECM) components and both soluble and membrane-associated growth factors³. Several studies have shown defective progenitor-stromal interactions in CML^{4,5}, and adhesive defects induced by BCR/ABL have been described⁶, although controversial results have been reported⁷. In this study, we examined the interaction of hematopoietic cells with stromal layers, co-culturing human cells derived from normal or CML individuals in different combinations.

Materials and methods

Samples

Bone marrow (BM) samples were obtained at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All CML patients were karyotyped as Ph⁺ (Table 1). Normal bone marrow was obtained as a fraction of cells collected from healthy individuals for transplantation procedures. Umbilical cord blood (CB) samples were collected after full-term vaginal deliveries, at Hospital Nossa Senhora da Conceição. All samples were obtained after approval by the Ethics Committee and with informed consent according to institutional guidelines.

Mononuclear cell isolation and CD34 selection

BM or CB mononuclear cells (MN) were prepared within 4 h of collection by centrifugation on Ficoll-Hypaque 1.077 (Histopaque, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). CD34⁺ cells were isolated by positive selection using an indirect immunomagnetic separation system (MACS CD34 Isolation Kit, Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA). Purity of the CD34⁺ cell fraction as determined by flow cytometry was over 91%, and the cell viability (analyzed with trypan blue) was greater than 95% in all cases.

Stromal layers

Stromal layers were cultured as previously described⁸. Briefly, mononuclear cells were suspended at 5×10^5 cells/ml in stroma medium consisting of Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Sigma) complemented with 10% fetal calf serum (Cultilab, Sao Paulo, Brazil). The cells were dispensed into 6-well culture plates (Corning, NY) at 5 ml per well, and the cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5%

CO₂ in air. Half the culture medium was replaced weekly with fresh medium. The cultures were examined once a week in a phase microscope (Carl-Zeiss, Germany).

Co-culture of hematopoietic progenitors and stromal layers

Stromal layers were irradiated with a dose of 1500 rad using a linear accelerator with 6 MV photons at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. CD34⁺ cells, in numbers ranging from 1.5 to 1.9 x 10⁵, were added. After 10 or 21 days of culture with no change in medium, the non-adherent cell fraction was collected, counted on a Neubauer chamber with trypan blue and analyzed by flow cytometry and clonogenic assay.

Flow cytometry

Cells were incubated for 30 min at room temperature with monoclonal antibodies specific for CD38/FITC, CD34/PE and CD45/PerCP (Pharmingen, San Jose, CA). Appropriate controls were used. Flow cytometry was performed on a FACScalibur (Becton Dickinson) equipped with an argon-ion laser tuned at 488 nm. The CELLQuest software (Becton Dickinson) was used. At least 10,000 events were collected in each determination.

Clonogenic assay

Non-adherent cells were suspended at 10³ cells/ml in MethoCult GF H4434 complete medium (StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada). Cells were plated in triplicate in 35 mm culture dishes (TPP, Switzerland) and incubated in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Colonies with more than 50 cells were scored after 14 days.

Results and discussion

Stromal layers developed well, from normal (five) as well from leukemic (three) bone marrow samples. The adherent layers were composed of heterogeneous cell types which included fibroblasts, macrophages and endothelial cells, reaching confluence in usually four weeks. The establishment of stroma, as well as the collection of CD34⁺ cells, was equivalent among CML patients treated or not treated.

Normal or leukemic hematopoietic cells were co-cultured with irradiated stromal layers for 10 or 21 days. Due to the experimental protocol employed, no statistical analysis were used; instead, cultures made with hematopoietic cells from the same source but different stromal layers, or vice-versa, were compared. In all conditions, the number of recovered viable cells in the non-adherent fraction decreased, but some of them seemed to be more efficient in keeping non-adherent cells alive (Table 2). This ability was dependent both on the sources of hematopoietic progenitors and stromal adherent layers, with normal cells performing better than their leukemic counterparts. In two of the co-culture conditions in which CML stroma was used (# 2 and 3), the loss of viable cells on day 10 was much greater than in all other cultures. The comparison of cultures 3 and 7, or 10 and 12, shows that hematopoietic cells from the same source were recovered in greater number from normal than from leukemic stroma. On the other hand, comparison of cultures 5 and 8, or 6 and 9, shows that cells derived from normal cord blood were recovered in greater number than those derived from leukemic sources, when cultivated on the same stromal layer. Some variability in this general pattern can be seen, as for instance when cultures 1, 2 and 4 are compared.

Cultures were also assayed for the maintenance of the stem/progenitor capacity, through immunophenotyping and analysis of clonogenic potential. The frequency of CD34⁺ or CD34⁺CD38⁻ cells in the non-adherent fraction was more related to the source of hematopoietic cells than of stroma, as shown by comparing cultures 2 and 4 or 3 and 7.

In cases where the same stroma was co-cultured with CD34⁺ cells from different sources, the results were different (cultures 5 x 8, or 6 x 9). Hematopoietic cells from normal subjects showed better performance. There was a general agreement between the two tests, although in some cases the number of colonies was higher or lower than that expected from the frequency of CD34⁺ CD38⁻ cells.

Substantial evidence of altered behavior of CML stem cells during *in vitro* cultivation has accumulated, and the molecular basis for these defects is being explored^{9,10}. Udomsakdi et al.¹¹ reported that maintenance of CML stem/progenitor cells in long term cultures is highly defective in comparison to normal cells. On the other hand, controversial reports on the functional capabilities of CML marrow microenvironment have been reported. Sparrow et al.¹² reported normal or enhanced supporting function of CML stroma for normal hematopoietic stem cells. Bhatia et al.¹³, however, reported abnormalities in the CML marrow environment, which were attributed to the presence of malignant stromal macrophages. Other cellular and functional abnormalities of the hematopoietic microenvironment in CML were described (reviewed by Mayani¹⁴). The simultaneous analysis of different combinations of normal and leukemic precursor cells and stromal layers, as done in the present work, suggests that the outcome of the interaction depends on characteristics of both compartments. These interactions are important in the design of procedures such as the *in vitro* purging of leukemic stem cells in CML autotransplants¹⁵ and BM transplantation, which depends on the proper anchoring of normal stem cells to the bone marrow stroma¹⁶.

Acknowledgments

We would like to thank Lizandra Nied, MD, for irradiating the adherent cell layers.

References

1. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987;328:342-344.
2. Nardi NB, Alfonso ZZ. The hematopoietic stroma. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32:601-609.
3. Prosper F, Verfaillie CM. Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leukoc Biol*. 2001;69(3):307-316.
4. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *J Clin Invest*. 1992;90:1232-1241.
5. Kramer A, Horner S, Willer A, et al. Adhesion to fibronectin stimulates proliferation of wild-type and bcr/abl-transfected murine hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:2087-2092.
6. Salesse S, Verfaillie CM. Mechanisms underlying abnormal trafficking and expansion of malignant progenitors in CML: BCR/ABL-induced defects in integrin function in CML. *Oncogene*. 2002;21:8605-8611.
7. van der Kuip H, Goetz AW, Miething C, Duyster J, Aulitzky WE. Adhesion to fibronectin selectively protects Bcr-Abl+ cells from DNA damage-induced apoptosis. *Blood*. 2001;98:1532-1541.
8. Alfonso ZZ, Forneck ED, Allebrandt WF, Nardi NB. Establishment of an adherent cell layer from human umbilical cord blood. *Genet Mol Biol*. 2000;23:519-522.
9. Cashman JD, Eaves CJ, Sarris AH, Eaves AC. MCP-1, not MIP-1alpha, is the endogenous chemokine that cooperates with TGF-beta to inhibit the cycling of

- primitive normal but not leukemic (CML) progenitors in long-term human marrow cultures. *Blood*. 1998;92:2338-2344.
10. Holyoake TL, Jiang X, Drummond MW, Eaves AC, Eaves CJ. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002;16:549-558.
 11. Udomsakdi C, Eaves CJ, Swolin B, Reid DS, Barnett MJ, Eaves AC. Rapid decline of chronic myeloid leukemic cells in long-term culture due to a defect at the leukemic stem cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:6192-6196.
 12. Sparrow RL, O'Flaherty E, Blanksby TM, Szer J, Van Der Weyden MB. Perturbation in the ability of bone marrow stroma from patients with acute myeloid leukemia but not chronic myeloid leukemia to support normal early hematopoietic progenitor cells. *Leuk Res*. 1997 Jan;21(1):29-36.
 13. Bhatia R, McGlave PB, Dewald GW, Blazar BR, Verfaillie CM. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood* 1995; 85:3636-3645.
 14. Mayani H. Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10:1041-1047.
 15. Eaves AC, Barnett MJ, Ponchio L, Cashman JD, Petzer AL, Eaves CJ. Differences between normal and CML stem cells: potential targets for clinical exploitation. *Stem Cells*. 1998;16 Suppl 1:77-83.
 16. Thiele J, Kvasnicka HM, Beelen DW, Cicek G, Leder LD, Schaefer UW. Dynamics of CD34+ progenitor cells following allogeneic bone marrow transplantation in Ph1+CML- -an immunohistochemical study on 113 patients with sequential trephine biopsies. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002;11:565-574.

Table 1. Patient's characteristics.

Sample	Age/Sex	CML stage	Treatment
CML1	33/M	Onset	None
CML2	43/F	Late chronic phase	Imatinib
CML3	45/F	Accelerated phase	Imatinib
CML4	42/M	Onset	None
CML5	28/F	Onset	None
CML6	47/M	Late Chronic phase	IFN α , Imatinib

Table 2. Cell recovery and frequency of hematopoietic progenitors after co-culture of normal and CML cells.

Culture #	Cell source		Cell index ¹		CD34 ⁺ (%)		CD34 ⁺ CD38 ⁻ (%)		Number of colonies ²	
	CD34 ⁺ cells	Stroma	day 10	day 21	day 10	day 21	day 10	day 21	day 10	day 21
	1	CB1	CML4	-1.7	0.0	ND	0.0	ND	0.0	7.8
2	CB1	CML5	-28.0	+0.02	51.5	0.0	11.5	0.0	2.3	0.00
3	CB3	CML6	-18.6	-0.01	61.3	5.8	9.3	0.0	2.2	5.30
4	CB1	Normal1	-11.3	-0.01	51.8	0.0	11.8	0.0	2.8	0.00
5	CB2	Normal2	-0.28	-0.02	90.4	0.0	2.4	0.0	26.3	17.20
6	CB2	Normal3	-0.28	-0.02	82.0	0.0	5.1	0.0	23.8	27.80
7	CB3	Normal4	-3.11	-0.14	50.1	8.5	7.5	0.2	7.6	6.80
8	CML1	Normal2	-4.8	-0.05	16.3	15.6	2.2	0.8	8.6	0.00
9	CML1	Normal3	-5.4	-0.05	12.7	9.6	1.7	1.1	11.5	0.00
10	CML2 ³	Normal5	-1.0	-0.08	ND	ND	ND	ND	0.58	0.01
11	CML3 ³	Normal5	-0.1	ND ⁴	ND	ND	ND	ND	0.61	0.01
12	CML2	CML6	-2.1	-0.07	ND	ND	ND	ND	0.66	0.00

CML- Chronic myeloid leukemia

CB - Blood cord

¹ Numbers refer to the decrease observed in the number of cells initially added to the irradiated stromal layers (x100 fold).

² No of colonies/1000 CD34⁺ cells added on day 0.

³ Samples consisted of 3 x 10⁷ MN cells.

⁴ Not determined.

INTERAÇÃO ENTRE ESTROMA E PROGENITORES HEMATOPOÉTICOS NORMAIS E DE LMC DURANTE CULTIVO *IN VITRO*

Elvira Alicia Aparicio Cordero¹, Lúcia Mariano da Rocha Silla¹, Andrés Delgado Cañedo²,
Waldir Francisco Allebrandt³, Laura Fogliatto¹, Nance Beyer Nardi²

¹Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Ossea, Hospital de Clínicas de
Porto Alegre; ²Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

³Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, RS, Brasil.

Apoio financeiro: FAPERGS, CAPES, FIPE (HCPA).

Palavras chave: leucemia mielóide crônica, BCR/ABL, cultivo in vitro, células CD34+,
camada estromal, suporte hematopoético, ensaio clonogênico

Correspondência para : Nance Beyer Nardi
Departamento de Genética, UFRGS
Caixa Postal 15053
91501-900, Porto Alegre RS, Brasil
Telefone: +55 (51) 33166740
Fax: +55 (51) 33167311
e-mail: nardi@ufrgs.br

Número total de palavras: 1185 palavras

Número de palavras no resumo: 149 palavras

Seção: Neoplasia

Título resumido: Cultura de estroma e progenitores normais e de LMC

Resumo

Diversos estudos têm mostrado interações anormais entre progenitor-stroma na leucemia mielóide crônica (LMC), e têm sido descritos defeitos de adesão induzidos por BCR/ABL, apesar de alguns resultados controversos. Nesse estudo, examinamos a interação entre células hematopoéticas humanas e camadas estromais irradiadas, derivadas de indivíduos normais e com LMC, co-cultivadas em diferentes combinações durante 10 ou 21 dias. A manutenção de células viáveis foi dependente tanto da origem da camada celular aderente quanto dos progenitores hematopoéticos, com as células normais apresentando uma maior capacidade de proliferação que as células leucêmicas. A frequência de células CD34⁺ CD38⁻ na fração não-aderente foi mais relacionada à origem das células hematopoéticas que ao estroma, e células hematopoéticas originadas de indivíduos normais foram melhor mantidas nas culturas. A análise simultânea de diferentes combinações celulares envolvendo camadas estromais e células progenitoras leucêmicas e normais, realizada neste trabalho, sugerem que o resultado da interação depende de características de ambos os compartimentos.

Introdução

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma desordem clonal maligna das células tronco hematopoéticas, resultando em hiperplasia mielóide na medula óssea assim como no aumento das células mielóides, eritróides e plaquetas no sangue periférico. Uma das características da diferenciação hematopoética afetadas pela expressão de BCR/ABL é a interação entre células hematopoéticas e o estroma da medula óssea¹. Para que a hematopoese ocorra normalmente, as células progenitoras hematopoéticas devem interagir com um microambiente adequado. O compartimento estromal inclui, entre outras células, os macrófagos, os fibroblastos, os adipócitos, e as células endoteliais², que desempenham um papel ativo na hematopoese pela produção dos componentes da matriz extracelular (ECM) e fatores de crescimento de membrana ou solúveis³. Diversos estudos têm mostrado uma interação progenitor-estroma deficiente na LMC^{4,5}, e defeitos de adesão induzidos por BCR/ABL têm sido descritos⁶, apesar de que resultados controversos tem sido relatados⁷. Nesse estudo, examinamos a interação entre progenitores hematopoéticos e a camada estromal, através do co-cultivo, em diferentes combinações, de células humanas derivadas de indivíduos normais e com LMC.

Materiais e métodos

Amostras

Amostras de medula óssea (BM) foram obtidas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os pacientes com LMC foram cariotipados como Ph⁺ (Tabela 1). Amostras de medula óssea normal foram obtidas a partir de coletas de indivíduos sadios realizadas para transplante. Amostras de sangue de cordão umbilical (CB) foram obtidas após parto normal, em gestações a termo, no Hospital Nossa Senhora da Conceição. Todas as amostras foram obtidas após aprovação dos Comitês de Ética e com consentimento informado de acordo normais institucionais.

Isolamento de células mononucleares e seleção de células CD34⁺

Células mononucleares (MN) de BM ou CB foram preparadas, em até 4 horas após a coleta, por centrifugação em Ficoll-Hypaque 1.077 (Histopaque, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Células CD34⁺ foram isoladas por seleção positiva usando um sistema de separação imunomagnética indireta (MACS CD34 Isolation Kit, Milteny Biotec Ins., Sunnyvale, CA). A pureza da fração de células CD34⁺, determinada por citometria de fluxo, foi superior a 91%, e a viabilidade celular (analisada com azul tripan) foi maior que 95% em todos os casos.

Camada estromal

As camadas estromais foram cultivadas como previamente descrito⁸. Resumidamente, células mononucleares foram suspensas numa concentração de 5×10^5 células/ml em meio Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM, Sigma) complementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, São Paulo, Brasil). As células foram distribuídas em placas de cultura de 6 poços (Corning, NY) a 5ml por poço, e as culturas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂ no ar. Metade do meio de cultura foi trocado semanalmente

por meio fresco. As culturas foram examinadas uma vez por semana em microscópio de contraste de fase (Carl-Zeiss, Germany).

Co-cultivo de progenitores hematopoéticos e da camada estromal

A camada estromal foi irradiada com 1500 rad usando um acelerador linear de 6 MV, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As células CD34⁺ foram adicionadas numa razão de $1,7 \times 10^5$ a 3×10^7 . Depois de 10 ou 21 dias de cultura sem troca de meio, a fração de células não aderentes foi coletada, contada na câmara de Neubauer com azul tripan e analisada por citometria de fluxo e ensaio clonogênico.

Citometria de fluxo

As células foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente com anticorpos monoclonais específicos para CD38/FITC, CD34/PE e CD45/PerCP (Pharmingen, San Jose, CA). Controles apropriados foram utilizados. A citometria de fluxo foi realizada em FACScalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de ion-argônio com 488 nm. O *software* CELLQuest foi usado. Ao menos 10000 eventos foram coletados.

Ensaio clonogênico

As células não aderentes foram suspensas numa concentração de 10^3 células/ml em meio completo de MethoCult GF H4434 (StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada). As células foram plaqueadas em triplicatas em placas de culturas de 35 mm (TPP, Suíça) e incubadas a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂. Colônias com mais de 50 células foram contadas após 14 dias.

Resultados e discussão

Camadas estromais desenvolveram-se bem, tanto de amostras de medula óssea normal (cinco) como também leucêmica (três). As camadas aderentes mostraram-se compostas de tipos celulares heterogêneos, incluindo fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, alcançando confluência usualmente em quatro semanas. O estabelecimento do estroma, assim como o processo de coleta de células CD34⁺, foram equivalentes entre pacientes leucêmicos tratados e não tratados.

Células hematopoéticas normais ou leucêmicas foram co-cultivadas durante 10 ou 21 dias com camadas estromais irradiadas. Devido ao protocolo experimental utilizado, não foram realizadas análises estatísticas; ao invés disto, cultivos realizados com células hematopoéticas da mesma fonte mas com diferentes camadas estromais, ou vice-versa, foram comparados. Em todas as condições, o número de células viáveis recuperadas na fração não aderente decresceu, mas algumas delas mostraram-se mais eficientes na manutenção da viabilidade da fração não aderente (Tabela 2). Esta habilidade mostrou-se dependente tanto da origem das células hematopoéticas como da camada estromal aderente, com melhor atuação das células normais que das leucêmicas. Em duas das condições de co-cultivo com estroma de LMC (# 2 e 3), a perda de células viáveis no dia 10 foi muito maior que em todas as outras culturas. A comparação das culturas 3 e 7, ou 10 e 12, mostra que células hematopoéticas de mesma origem foram recuperadas em maior número de cultivo com estroma normal que leucêmico. Por outro lado, a comparação das culturas 5 e 8, ou 6 e 9, mostra que células derivadas da medula óssea normal foram recuperadas em maior número que as de origem leucêmica, quando cultivadas sobre a mesma camada estromal. Uma certa variabilidade neste padrão geral pode ser vista, como por exemplo quando as culturas 1, 2 e 4 são comparadas.

As culturas também foram analisadas quanto à manutenção das células tronco/progenitoras. Duas abordagens experimentais foram utilizadas, imunofenotipagem

e análise do potencial clonogênico. A frequência de células CD34⁺ ou CD34⁺CD38⁻ na fração não aderente mostrou-se mais relacionada com a origem das células hematopoéticas que do estroma, como mostra a comparação das culturas 2 e 4 ou 3 e 7. Nos casos onde o mesmo estroma foi co-cultivado com células CD34⁺ de diferentes origens, os resultados foram diferentes (culturas 5 x 8, ou 6 x 9). Células hematopoéticas de indivíduos normais mostraram melhor desempenho. Houve uma concordância geral entre os dois testes, embora em alguns casos o número de colônias tenha sido maior ou menor que a frequência esperada de células CD34⁺CD38⁻.

Evidências apontando um comportamento anormal de células tronco em pacientes com LMC durante o cultivo *in vitro* têm sido acumuladas, e as bases moleculares destes defeitos estão sendo exploradas^{9,10}. Udomsakdi *et al.*¹¹ observaram que a manutenção de células tronco/hematopoéticas de LMC em culturas de longa duração é altamente deficiente em comparação com células normais. Por outro lado, alguns estudos controversos relativos à capacidade funcional do microambiente medular na LMC têm sido publicados. Sparrow *et al.*¹² observaram que o estroma leucêmico apresenta uma função de suporte à hematopoese normal ou aumentada. Bhatia *et al.*¹³, entretanto, mostraram anormalidades no microambiente medular na LMC, atribuídos à presença de macrófagos no estroma leucêmico. Outras anormalidades celulares e funcionais do microambiente hematopoético na LMC foram descritas (revisado por Mayani¹⁴). A análise simultânea de diferentes combinações de camada estromal e células progenitoras leucêmicas e normais, realizada no presente estudo, sugere que o resultado da interação depende de características de ambos os compartimentos. Estas interações são importantes na programação de procedimentos tais como o *purging in vitro* de células tronco leucêmicas para o autotransplante na LMC¹⁵ e transplante de medula óssea, que dependem de um adequado ancoramento de células tronco normais no estroma medular¹⁶.

Agradecimentos

Agradecemos a Lizandra Nied, MD, pelo auxílio na irradiação da camada celular aderente.

Referências

1. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987;328:342-344.
2. Nardi NB, Alfonso ZZ. The hematopoietic stroma. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32:601-609.
3. Prosper F, Verfaillie CM. Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leukoc Biol*. 2001;69(3):307-316.
4. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *J Clin Invest*. 1992;90:1232-1241.
5. Kramer A, Horner S, Willer A, et al. Adhesion to fibronectin stimulates proliferation of wild-type and bcr/abl-transfected murine hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:2087-2092.
6. Salesse S, Verfaillie CM. Mechanisms underlying abnormal trafficking and expansion of malignant progenitors in CML: BCR/ABL-induced defects in integrin function in CML. *Oncogene*. 2002;21:8605-8611.
7. van der Kuip H, Goetz AW, Miething C, Duyster J, Aulitzky WE. Adhesion to fibronectin selectively protects Bcr-Abl+ cells from DNA damage-induced apoptosis. *Blood*. 2001;98:1532-1541.
8. Alfonso ZZ, Forneck ED, Allebrandt WF, Nardi NB. Establishment of an adherent cell layer from human umbilical cord blood. *Genet Mol Biol*. 2000;23:519-522.
9. Cashman JD, Eaves CJ, Sarris AH, Eaves AC. MCP-1, not MIP-1alpha, is the endogenous chemokine that cooperates with TGF-beta to inhibit the cycling of

- primitive normal but not leukemic (CML) progenitors in long-term human marrow cultures. *Blood*. 1998;92:2338-2344.
10. Holyoake TL, Jiang X, Drummond MW, Eaves AC, Eaves CJ. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002;16:549-558.
 11. Udomsakdi C, Eaves CJ, Swolin B, Reid DS, Barnett MJ, Eaves AC. Rapid decline of chronic myeloid leukemic cells in long-term culture due to a defect at the leukemic stem cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:6192-6196.
 12. Sparrow RL, O'Flaherty E, Blanksby TM, Szer J, Van Der Weyden MB. Perturbation in the ability of bone marrow stroma from patients with acute myeloid leukemia but not chronic myeloid leukemia to support normal early hematopoietic progenitor cells. *Leuk Res*. 1997 Jan;21(1):29-36.
 13. Bhatia R, McGlave PB, Dewald GW, Blazar BR, Verfaillie CM. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood* 1995; 85:3636-3645.
 14. Mayani H. Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10:1041-1047.
 15. Eaves AC, Barnett MJ, Ponchio L, Cashman JD, Petzer AL, Eaves CJ. Differences between normal and CML stem cells: potential targets for clinical exploitation. *Stem Cells*. 1998;16 Suppl 1:77-83.
 16. Thiele J, Kvasnicka HM, Beelen DW, Cicek G, Leder LD, Schaefer UW. Dynamics of CD34+ progenitor cells following allogeneic bone marrow transplantation in Ph1+CML- -an immunohistochemical study on 113 patients with sequential trephine biopsies. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002;11:565-574.

Tabela 1. Características dos pacientes.

Amostra	Idade/sexo	Estágio da LMC	Tratamento
CML1	33/M	Diagnóstico	Nenhum
CML2	43/F	Fase crônica tardia	Glivec
CML3	45/F	Fase acelerada	Glivec
CML4	42/M	Diagnóstico	Nenhum
CML5	28/F	Diagnóstico	Nenhum
CML6	47/M	Fase crônica tardia	IFN α , Glivec

Tabela 2. Células viáveis recuperadas e frequência de progenitores hematopoéticos após co-cultivo de células leucêmicas e normais.

Cultura #	Origem das células		Índice celular ¹		CD34 ⁺ (%)		CD34 ⁺ CD38 ⁻ (%)		Número de colônias ²	
	Células CD34 ⁺	Estroma	dia	dia	dia	dia	dia	dia	dia	dia
			10	21	10	21	10	21	10	21
1	CB1	CML4	-1,7	0,0	ND	0,0	ND	0,0	7,8	0,00
2	CB1	CML5	-28,0	+0,02	51,5	0,0	11,5	0,0	2,3	0,00
3	CB3	CML6	-18,6	-0,01	61,3	5,8	9,3	0,0	2,2	5,30
4	CB1	Normal1	-11,3	-0,01	51,8	0,0	11,8	0,0	2,8	0,00
5	CB2	Normal2	-0,28	-0,02	90,4	0,0	2,4	0,0	26,3	17,20
6	CB2	Normal3	-0,28	-0,02	82,0	0,0	5,1	0,0	23,8	27,80
7	CB3	Normal4	-3,11	-0,14	50,1	8,5	7,5	0,2	7,6	6,80
8	CML1	Normal2	-4,8	-0,05	16,3	15,6	2,2	0,8	8,6	0,00
9	CML1	Normal3	-5,4	-0,05	12,7	9,6	1,7	1,1	11,5	0,00
10	CML2 ³	Normal5	-1,0	-0,08	ND	ND	ND	ND	0,58	0,01
11	CML3 ³	Normal5	-0,1	ND ⁴	ND	ND	ND	ND	0,61	0,01
12	CML2	CML6	-2,1	-0,07	ND	ND	ND	ND	0,66	0,00

CML- Leucemia mieloide crônica

CB – Sangue de cordão umbilical

¹ Número referente ao decréscimo observado no número de células inicialmente adicionadas à camada estromal irradiada (x100)

² Número de colônias /1000 células CD34⁺ adicionadas no dia 0.

³ Amostras consistiram de 3×10^7 células MN.

⁴ Não determinado.

Persistence of BCR/ABL positive progenitor cells during in vitro culture.

Elvira Aparicio-Cordero^a, Nance Nardi^b, Andrés Delgado-Cañedo^b, Laura Fogliatto^a, Lúcia
Mariano da Rocha Silla^{a*}

^a Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Ossea , Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, P. Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author.

Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Ossea, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90053-003, Porto Alegre, RS, Brazil
FAX number: +55 (51) 33168317; e-mail: lsilla@hcpa.ufrgs.br

Keyword: chronic myeloid leukemia, BCR/ABL, in vitro culture, CD34+ cell, clonogenic assay, Philadelphia chromosome

Acknowledgments: Research supported by FAPERGS, CAPES, FIPE (HCPA).

Abstract

To investigate the role of hematopoietic components on the survival of BCR/ABL positive cells in vitro, chronic myeloid leukemia (CML) progenitor cells were cultivated in different conditions. The frequency of leukemic progenitors was analyzed by clonogenic assay followed by RT-PCR. The cultivation of mononuclear cells or of the purified CD34⁺ cell fraction resulted in the maintenance of BCR/ABL positive progenitor cells in equivalent proportions. In the conditions established in this study, the reversal of proliferative advantage of BCR/ABL progenitor cells was not noticed, suggesting that, in our experimental design the behavior of the leukemic cell is more dependent on intrinsic characteristics than on external factors.

Abbreviations

CML - chronic myeloid leukemia

Ph - Philadelphia

NK - natural killer

BM - bone marrow

MN - mononuclear

1. Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disease resulting from the genetic alteration of a multipotent hematopoietic stem cell, which keeps its ability to differentiate to functional, mature hematopoietic cells. CML cells are characterized cytogenetically by the presence of the Philadelphia chromosome (Ph), t(9;22)(q34;q11). At the molecular level, the Ph translocation results in the juxtaposition of the protooncogene c-ABL on chromosome 9 to the BCR gene on chromosome 22, originating the hybrid gene BCR/ABL. The fusion protein encoded, p210, presents increased tyrosine kinase activity and results in augmented proliferative advantage for CML cells.

It is now well established that normal hematopoiesis persists in CML patients, and several strategies have been proposed to purge Ph-positive cells from the graft [1]. The long term cultivation of CML bone marrow has shown the reversal of the proliferative advantage presented by the Ph⁺ progenitor cells in vivo [2]. Somewhat conflicting results about growth factor requirement by CML progenitor cells were reported [3], and the biological basis of the phenomenon is not fully understood. A role for natural killer (NK) cells has been suggested, since activated NK cells with antileukemic activity can be generated from the peripheral blood of CML patients and have been shown to correlate with the disappearance of BCR/ABL⁺ cells during in vitro culture [4]. It has also been reported that cell lines expressing high levels of BCR/ABL are more susceptible to NK cell cytotoxicity [5].

In the present study, progenitor cells from CML patients were cultivated in vitro, as part of the mononuclear fraction or after purification in magnetic columns, to investigate the role of other bone marrow components on the survival of BCR/ABL positive cells in vitro.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Bone marrow (BM) samples were collected at Hospital de Clínicas de Porto Alegre from CML patients, after approval by the Ethics Committee and with informed consent according to institutional guidelines. All samples were karyotyped by conventional methods. The results, as well as other characteristics of the patients, are presented in Table 1.

2.2. Mononuclear cell isolation and CD34 selection

Mononuclear cells (MN) were prepared from fresh BM by centrifugation (30 min, 400 g) on Ficoll-Hypaque 1.077 (Histopaque, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Progenitor cells were isolated by positive selection of CD34⁺ cells with an indirect immunomagnetic separation system (MACS CD34 Isolation Kit, Miltenyi Biotec Inc., Sunnyvale, CA). Purity of the CD34⁺ cell fraction was determined by flow cytometry, maintaining over 90%, and the cell viability (analyzed with trypan blue) was greater than 95% in all cases.

2.3. Cell culture and clonogenic assay

The mononuclear cells or the purified CD34⁺ cells were suspended in StemSpan medium (Sigma), at concentrations of 5×10^5 cells/ml, and dispensed into 6-well culture plates (Corning, NY) at 3 ml per well. The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After one week, non-adherent cells were collected and suspended in MethoCult GF H4434 complete medium (StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada). Cells were plated in triplicate in 35 mm culture dishes (TPP, Switzerland) and incubated in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Colonies were individually collected on day 14 - 21 and analyzed by RT-PCR.

2.5. RT-PCR

The expression of BCR/ABL in the fresh MN or CD34⁺ cell samples and in the individual colonies derived from the clonogenic assay was analyzed by RT-PCR. Total RNA was extracted with TRIZOL (Gibco BRL, Grand Island, NY), and converted to cDNA with the use of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. A volume of 5 µl of the cDNA produced by the reverse transcriptase reaction was made up to a final volume of 25 µl containing 4 mM of each dNTP, 10 mM Tris.HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 1 unit Taq polymerase (Invitrogen) and 0.4 pmol of each primer. The antisense primer derived from ABL exon II was 5'CTCCACTGGCCACAAAAT3' and the sense primer derived from M-bcr exon b2 was 5'TTCAGAAGCTTCTCCCTG3' [6]. The samples were submitted to 40 cycles of PCR in a MJ Research, Inc thermocycler. The samples were heated at 95°C for 2 min initially and for 40 s in each subsequent cycle to denature DNA. Primers were allowed to anneal at 58°C for 40 s and the strand extension was carried out at 72°C for 40 s with a final extension step of 7 min. Individual colonies were analyzed by nested RT-PCR. For that, 5 µl of the material originated from the first amplification round was amplified during a second round of PCR with the M-bcr sense primer 5'GTGAAACTCCAGACTGTC3' and ABL antisense primer 5'CAACGAAAAGGTTGGGGT3' [6]. These primers specify a 327 bp fragment in BCR/ABL rearranged cells with M-bcr exon b3 linked to ABL exon II.

2.5. Statistical analysis

Results were analyzed by the Student's t test for paired samples, using SPSS for Windows v 10.0.1 (SPSS Inc.).

3. Results and discussion

As presented in Table 2, the in vitro cultivation of mononuclear cells or of the purified CD34⁺ cell fraction originated from CML bone marrow resulted in the maintenance of BCR/ABL positive progenitor cells in equivalent proportions. In the first case, 60±0.17% of the colonies were BCR/ABL positive, whereas among the colonies derived from isolated CD34⁺ cells the frequency was 68±0.25%, a difference not statistically significant.

In the conditions established in this study, the reversal of proliferative advantage of BCR/ABL progenitor cells over their normal counterparts during in vitro culture was not noticed. This was probably due to the lack of some growth/differentiation factor (see [3]). Similarly, cultivation of the progenitor cells highly purified or among other cells from the mononuclear fraction did not result in different maintenance of BCR/ABL positive progenitor cells, showing that under these conditions the activity of NK cells over the leukemic clone, observed when CML peripheral blood is cultivated [4], is not detected. Although it is known that BCR/ABL effects include modifications on the interaction of hematopoietic cells with their microenvironment [7], our results support the suggestion that the behavior of the leukemic cell is more dependent on intrinsic characteristics than on external factors [3].

The survival of BCR/ABL positive cells after three months of Glivec treatment, observed by karyotyping in four of the cases and by RT-PCR in one of them (patient 2), shows that malignant hematopoietic progenitors can survive imatinib mesylate treatment, even when cytogenetic remission is attained, as already reported [8].

References

- [1] Guyotat D, Wahbi K, Viallet A, Piselli S, Campos L. Selection of BCR/ABL-negative stem cells from marrow or blood of patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1999;13:991-8.
- [2] Coulombel L, Kalousek DK, Eaves CJ, Gupta CM, Eaves AC. Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1983;308:1493-8.
- [3] Ferrero D, Foli C, Giaretta F, Argentino C, Rus C, Pileri A. Growth advantage of chronic myeloid leukemia CFU-GM in vitro: survival to growth factor deprivation, possibly related to autocrine stimulation, is a more common feature than hypersensitivity to GM-CSF/IL3 and is efficiently counteracted by retinoids +/- alpha-interferon. *Leukemia* 2001;15:422-9.
- [4] Silla LM, Pincus SM, Locker JD, Glover J, Elder EM, Donnenberg AD, Nardi NB, Bryant J, Ball ED, Whiteside TL. Generation of activated natural killer (A-NK) cells in patients with chronic myelogenous leukaemia and their role in the in vitro disappearance of BCR/abl-positive targets. *Br J Haematol* 1996;93:375-85.
- [5] Baron F, Turhan AG, Giron-Michel J, Azzarone B, Bentires-Alj M, Bours V, Bourhis JH, Chouaib S, Caignard A. Leukemic target susceptibility to natural killer cytotoxicity: relationship with BCR-ABL expression. *Blood* 2002;99:2107-13.
- [6] Lion T, Prischl F, Haas AO, Pont J, Schwarzmeier J. Non-radioactive detection of the rearranged BCR/ABL sequences amplified by polymerase chain reaction. *Leukemia* 1991;5:156-9.
- [7] Salessse S, Verfaillie CM. Mechanisms underlying abnormal trafficking and expansion of malignant progenitors in CML: BCR/ABL-induced defects in integrin function in CML. *Oncogene* 2002;21:8605-11.
- [8] Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL, Arber DA, Slovak ML, Forman SJ. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* 2003 Feb 6 [epub ahead of print]

Table 1

Patient's characteristics.

Patient	Age/Sex	Karyotyping	CML stage	Treatment
1	49/M	Ph ⁺	Late chronic phase	Glivec ^a
2	71/M	Ph ⁻	Chronic phase	Glivec
3	39/M	Ph ⁺	Accelerated phase	Glivec
4	54/M	Ph ⁺	Accelerated phase	Glivec
5	43/F	Ph ⁺	Accelerated phase	Glivec
6	73/F	Ph ⁺	Late chronic phase	IFN- α
7	47/M	Ph ⁺	BMT ^b	-
8	51/M	Ph ⁺	Accelerated phase	- ^c

^a Glivec (imatinib mesylate) administered for three months in all cases.

^b Bone marrow transplantation performed 18 months earlier.

^c Patient had abandoned treatment six months before sample collection.

Table 2

Number (frequency) of BCR/ABL+ colonies derived from pre-cultivated mononuclear (MN) or CD34+ cells.

Patient	BCR/ABL+ MN	BCR/ABL+ CD34+
1	3/8 (0.37)	19/25 (0.76)
2	12/23 (0.52)	8/25 (0.32)
3	11/23 (0.48)	10/22 (0.45)
4	6/8 (0.75)	12/22 (0.54)
5	NA ^a	17/18 (0.94)
6	7/8 (0.87)	28/29 (0.96)
7	8/15 (0.53)	20/21 (0.95)
8	6/9 (0.67)	5/9 (0.55)

^a Not analyzed.

Manutenção de células progenitoras BCR/ABL positivas durante o cultivo in vitro

Elvira Cordero^a, Nance Nardi^b, Andrés Delgado^b, Laura Fogliatto^a, Lúcia Silla^{a*}

^a Serviço de Hematologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, P. Alegre, RS, Brasil

^b Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil

* Serviço de Hematologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, P. Alegre, RS, Brasil
Fax number: +55 (51) 33168317; e-mail: lsilla@hcpa.ufrgs.br

Palavras chave: leucemia mielóide crônica, BCR/ABL, cultivo in vitro, células CD34+, ensaio clonogênico, cromossomo Philadelphia

Agradecimentos: Apoio financeiro da FAPERGS, CAPES, FIPE (HCPA).

Resumo

Com o objetivo de investigar o papel de componentes hematopoéticos na sobrevivência de células BCR/ABL positivas in vitro, células progenitoras de pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC) foram cultivadas em diferentes condições. A frequência de progenitores leucêmicos foi analisada por ensaio clonogênico seguido de RT-PCR. O cultivo das células mononucleares ou da fração de células CD34⁺ purificadas resultou na manutenção das células progenitoras BCR/ABL positivas em proporções equivalente. Nas condições estabelecidas no presente estudo, não foi observada uma reversão na vantagem proliferativa das células progenitoras BCR/ABL, o que sugere que o comportamento das células leucêmicas depende mais de características intrínsecas que de fatores externos.

Abreviaturas

LMC - leucemia mielóide crônica

Ph - Philadelphia

NK - *natural killer*

BM - medula óssea

MN - mononuclear

1. Introdução

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença clonal mieloproliferativa que resulta da alteração genética de células tronco hematopoéticas multipotentes, as quais mantêm a capacidade de diferenciar em células funcionais hematopoéticas maduras. Células de LMC são caracterizadas citogeneticamente pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), t(9;22)(q34;q11). Ao nível molecular, a translocação Ph resulta na justaposição do protooncogene c-ABL no cromossomo 9 ao gene BCR no cromossomo 22, originando o gene híbrido BCR/ABL. A proteína de fusão codificada, p210, apresenta uma atividade tirosinoquinase aumentada e provoca uma vantagem proliferativa das células de LMC.

Atualmente, é bem estabelecido que nos pacientes com LMC persiste a hematopoese normal, e várias estratégias têm sido propostas para eliminar células Ph-positivas em autotransplantes [1]. O cultivo de longa duração de células da medula óssea de pacientes com LMC tem mostrado que existe reversão na vantagem proliferativa que as células progenitoras Ph⁺ exibem in vivo [2]. Alguns resultados controversos sobre a necessidade de fatores de crescimento por parte dos progenitores originados de pacientes com LMC foram publicados [3], e a base biológica do fenômeno ainda não é bem compreendida. Tem sido sugerido um papel para as células *natural killer* (NK), já que células NK ativadas podem ser geradas a partir do cultivo in vitro de sangue periférico de pacientes com LMC; estas células têm atividade anti-leucêmica, e sua presença está relacionada com o desaparecimento das células BCR/ABL+ durante o cultivo in vitro [4]. Tem sido também observado que linhagens celulares expressando altos níveis de BCR/ABL são mais sensíveis à lise por células NK [5].

Neste trabalho, células progenitoras de pacientes com LMC foram cultivadas in vitro, ou como parte da fração mononuclear ou após sua purificação em colunas magnéticas, para a análise do papel de outros componentes da medula óssea na sobrevivência de células BCR/ABL positivas in vitro.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras

Amostras de medula óssea (BM) foram coletadas de pacientes com LMC no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e com consentimento pós-informação, conforme as normas institucionais. Todas as amostras foram cariotipadas por métodos convencionais. Os resultados, assim como outras características dos pacientes, são apresentados na Tabela 1.

2.2. Isolamento de células mononucleares e seleção CD34

Células mononucleares (MN) foram preparadas a partir da BM por centrifugação (30 min, 400 g) em Ficoll-Hypaque 1.077 (Histopaque, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Células progenitoras foram isoladas por seleção positiva das células CD34⁺ com um sistema de separação imunomagnética indireta (MACS CD34 Isolation Kit, Miltenyi Biotec Inc., Sunnyvale, CA). A pureza da fração de células CD34⁺ foi determinada por citometria de fluxo, sendo mantida acima de 90%, e a viabilidade celular (analisada com azul tripan) foi maior que 95% em todos os casos.

2.3. Cultivo celular e ensaio clonogênico

As células mononucleares ou as células CD34⁺ purificadas foram suspensas em meio StemSpan (Sigma), em concentração de 5×10^5 células/ml, e dispensadas em placas de cultivo de 6 poços (Corning, NY), em volume de 3 ml por poço. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂ no ar. Após uma semana, as células não aderentes foram coletadas e suspensas em meio completo MethoCult GF H4434 (StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada). As células foram plaqueadas em triplicata em placas de cultivo de 35 mm (TPP, Suíça) e incubadas a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂. As colônias formadas foram coletadas individualmente entre os dias 14 e 21 e analisadas por RT-PCR.

2.5. RT-PCR

A expressão de BCR/ABL nas células MN ou CD34+ frescas e nas colônias derivadas do ensaio clonogênico foi analisada por RT-PCR. RNA total foi extraído com TRIZOL (Gibco BRL, Grand Island, NY) e convertido a cDNA com utilização de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Um volume final de 25 µl de reação foi preparado, contendo 5 µl do cDNA produzido pela reação da transcriptase reversa, 4 mM de cada dNTP, 10 mM Tris.HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 1 unidade de Taq polimerase (Invitrogen) e 0,4 pmol de cada *primer*. O *primer* antisense, derivado do exon II de ABL, foi 5'CTCCACTGGCCACAAAAT3' e o *primer* senso derivado do exon b2 de M-bcr foi 5'TTCAGAAGCTTCTCCCTG3' [6]. As amostras foram submetidas a 40 ciclos de PCR em um termociclador da MJ Research, Inc. As amostras foram aquecidas a 95°C por 2 min inicialmente e por 40 s em cada ciclo subsequentemente, para desnaturação do DNA. O anelamento dos *primers* ocorreu a 58°C por 40 s e a extensão das fitas foi feita a 72°C por 40 s, com uma etapa final de extensão de 7 min. Colônias individuais foram analisadas por *nested* RT-PCR. Para isto, 5 µl do material originado do primeiro processo de amplificação foram amplificados em um segundo ciclo de PCR com o *primer* senso do M-bcr 5'GTGAAACTCCAGACTGTC3' e o antisense do ABL 5'CAACGAAAAGGTTGGGGT3' [6]. Estes *primers* especificam um fragmento de 327 bp em células com o rearranjo BCR/ABL onde o exon b3 de M-bcr está unido ao exon II de ABL.

2.5. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas, empregando-se o programa SPSS para Windows v 10.0.1 (SPSS Inc.).

3. Resultados e discussão

Conforme apresentado na Tabela 2, o cultivo in vitro de células mononucleares ou da fração de células CD34+ purificadas, originadas de medula óssea de pacientes com LMC, resultou na manutenção de progenitores BCR/ABL positivos em proporções equivalentes. No primeiro caso, $60 \pm 0.17\%$ das colônias foram BCR/ABL positivas, enquanto entre as colônias derivadas de células CD34+ isoladas a frequência foi de $68 \pm 0.25\%$, uma diferença não significativa estatisticamente.

Nas condições estabelecidas neste estudo, não foi observada uma reversão da vantagem proliferativa dos progenitores BCR/ABL positivos sobre os progenitores normais durante o cultivo. Isto deveu-se provavelmente à falta de algum fator de crescimento ou diferenciação (ver [3]). Do mesmo modo, o cultivo de células progenitoras altamente purificadas ou entre outras células da fração mononuclear não resultou na manutenção diferencial das células progenitoras BCR/ABL positivas, indicando que nestas condições não é detectada uma atividade de células NK sobre o clone leucêmico, que pode ser observado quando sangue periférico de pacientes com LMC é cultivado [4]. Apesar de saber-se que os efeitos do gene BCR/ABL incluem modificações na interação entre as células hematopoéticas e seu meio ambiente [7], nossos resultados apóiam a sugestão de que o comportamento das células leucêmicas é mais dependente de características intrínsecas que de fatores externos [3].

A sobrevivência de células BCR/ABL positivas após 3 meses de tratamento com Glivec, observada pela cariotipagem em 4 dos casos e por RT-PCR em um deles (paciente 2), mostra que progenitores hematopoéticos leucêmicos podem sobreviver ao tratamento com imatinibe, mesmo quando a remissão citogenética é alcançada, conforme recentemente divulgado [8].

Referências

- [1] Guyotat D, Wahbi K, Viallet A, Piselli S, Campos L. Selection of BCR/ABL-negative stem cells from marrow or blood of patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1999;13:991-8.
- [2] Coulombel L, Kalousek DK, Eaves CJ, Gupta CM, Eaves AC. Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1983;308:1493-8.
- [3] Ferrero D, Foli C, Giaretta F, Argentino C, Rus C, Pileri A. Growth advantage of chronic myeloid leukemia CFU-GM in vitro: survival to growth factor deprivation, possibly related to autocrine stimulation, is a more common feature than hypersensitivity to GM-CSF/IL3 and is efficiently counteracted by retinoids +/- alpha-interferon. *Leukemia* 2001;15:422-9.
- [4] Silla LM, Pincus SM, Locker JD, Glover J, Elder EM, Donnenberg AD, Nardi NB, Bryant J, Ball ED, Whiteside TL. Generation of activated natural killer (A-NK) cells in patients with chronic myelogenous leukaemia and their role in the in vitro disappearance of BCR/abl-positive targets. *Br J Haematol* 1996;93:375-85.
- [5] Baron F, Turhan AG, Giron-Michel J, Azzarone B, Bentires-Alj M, Bours V, Bourhis JH, Chouaib S, Caignard A. Leukemic target susceptibility to natural killer cytotoxicity: relationship with BCR-ABL expression. *Blood* 2002;99:2107-13.
- [6] Lion T, Prischl F, Haas AO, Pont J, Schwarzmeier J. Non-radioactive detection of the rearranged BCR/ABL sequences amplified by polymerase chain reaction. *Leukemia* 1991;5:156-9.
- [7] Salessse S, Verfaillie CM. Mechanisms underlying abnormal trafficking and expansion of malignant progenitors in LMC: BCR/ABL-induced defects in integrin function in LMC. *Oncogene* 2002;21:8605-11.
- [8] Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL, Arber DA, Slovak ML, Forman SJ. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* 2003 Feb 6 [epub ahead of print]

Tabela 1

Características dos pacientes.

Paciente	Idade/Sexo	Cariótipo	Estágio da LMC	Tratamento
1	49/M	Ph ⁺	Fase crônica tardia	Glivec ^a
2	71/M	Ph ⁻	Fase crônica	Glivec
3	39/M	Ph ⁺	Fase acelerada	Glivec
4	54/M	Ph ⁺	Fase acelerada	Glivec
5	43/F	Ph ⁺	Fase acelerada	Glivec
6	73/F	Ph ⁺	Fase crônica tardia	IFN- α
7	47/M	Ph ⁺	TMO ^b	-
8	51/M	Ph ⁺	Fase acelerada	- ^c

^a Glivec (imatinibe) administrado por 3 meses em todos os casos.

^b Transplante de medula óssea realizado 18 meses antes.

^c Paciente havia abandonado o tratamento 6 meses antes da coleta de amostra.

Tabela 2

Número (frequência) de colônias BCR/ABL+ derivadas de células mononucleares (MN) ou células CD34+ pré-cultivadas.

Paciente	MN BCR/ABL+	CD34+ BCR/ABL+
1	3/8 (0,37)	19/25 (0,76)
2	12/23 (0,52)	8/25 (0,32)
3	11/23 (0,48)	10/22 (0,45)
4	6/8 (0,75)	12/22 (0,54)
5	NA ^a	17/18 (0,94)
6	7/8 (0,87)	28/29 (0,96)
7	8/15 (0,53)	20/21 (0,95)
8	6/9 (0,67)	5/9 (0,55)

^a Não analisado.

ANEXOS

Anexo 1: Texto para coleta de dados

FICHA DE DADOS

- Nome:
- Código de identificação do paciente:
- Data de nascimento: Idade:
- Sexo:
- Cor:
- Data do diagnóstico:
- Sintomas iniciais:
- Hemograma ao diagnóstico:
- Cariograma Ph(+): Sim: Não:
- Tipo de tratamento:
 - Meses:
 - Hidroxiureia (HU):
 - INF α :
 - HU + INF α :
 - INF α + Arabinosideo C:
 - TMO:
- Fase no momento do estudo:
 - Crônica:
 - Crônica tardia (>1ano):
 - Acelerada:
 - Aguda:
- Resposta Citogenética:
 - Menor:
 - Maior (>35%):
- Resposta Molecular (RT - PCR):

Observações:

Anexo 2: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE CÉLULAS PROGENITORAS BCR/ABL
POSITIVAS DURANTE O CULTIVO *IN VITRO***

Prezado paciente:

O presente projeto consiste do estudo das células tronco hematopoiéticas (células mães do sangue) presentes na medula óssea de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC), tais células possuem alterações genéticas (translocação BCR/ABL). Este estudo tem como objetivo avaliar o comportamento de células BCR/ABL positivas coletadas de diferentes pacientes.

Para a realização deste estudo será coletada uma quantidade adicional de 20ml de sangue periférico ou 5 ml de amostra de medula óssea, no momento em que o Sr(a) realizar a coleta de sangue ou amostra de medula prevista para o seu atendimento. O risco da coleta de sangue periférico pode ser um pequeno hematoma, isto é, um pequeno derramamento de sangue no local da coleta. A amostra de medula óssea é obtida por punção de medula óssea, que é um exame rotineiramente realizado para avaliar a evolução da LMC, já que está prevista no seu tratamento. Os exames serão realizados por um profissional habilitado, usando todas as técnicas adequadas e material descartável e estéril.

Os benefícios envolvidos são os de possibilitar entender melhor a evolução da doença e assim ajudar a delinear novos tratamentos. O material adicional obtido será cultivado, sendo somente utilizado para fins de estudo, seu uso para qualquer outras finalidades será vetado.

Asseguramos que preservaremos sua privacidade e que em hipótese alguma, sua identidade será revelada, seja no decorrer de nosso estudo ou após o término deste.

Mesmo aceitando participar do estudo você tem a liberdade de retirar seu consentimento de participação, se assim o desejar. Se você não concorda em participar, este fato não irá interferir com o seu tratamento que continuará o mesmo.

Caso aceite participar assine o consentimento abaixo:

Nome do paciente ou responsável: _____

Assinatura do paciente ou responsável: _____

Número do prontuário: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Telefone para esclarecimentos: 0XX51 33168317.