

**Claudia Bincoletto**

**AUTOPROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DO PROTO-  
ONCOGENE Bcl-2 EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE  
AGUDA (LMA) E SÍNDROME MIELODISPLÁSICA (SMD)**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato a)

*Claudia Bincoletto*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Marcelo*

*01/6/98*

**Campinas, 1998**

**B51a**

**34728/BC**



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Unicamp
B.51a.	
V.	Ex.
TONELADO	34728
PREC.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PRECÇO	R\$ 11,00
DATA	11/08/98
N.º CPD	

CM-00115348-B



**Claudia Bincoletto**

***AUTOPROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DO PROTO-ONCOGENE  
Bcl-2 EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (LMA) E  
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA (SMD)***

Tese de Doutorado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação do Instituto  
de Biologia, da Universidade Estadual  
de Campinas, para obtenção do título  
de Doutor em Ciências Biológicas.

**Orientadora:** Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

**Campinas, 1998**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Bincoletto, Claudia**

B51a Autoproliferação celular e expressão do proto-oncogene Bcl-2 em  
pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e síndrome mielodisplásica  
(SMD) / Claudia Bincoletto. -- Campinas, SP:[s.n.], 1998.  
64f.: ilus.

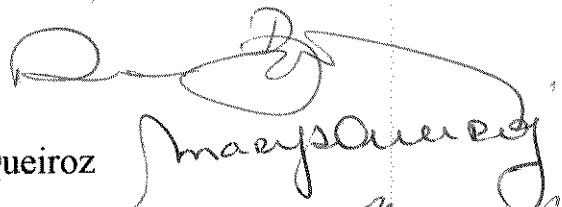
Orientadora: Mary Luci de Souza Queiroz  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

1. Células - Cultura . 2. Proliferação celular. 3. Hematopoese.  
I. Queiroz, Mary Luci de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 09 de abril de 1998

### **TITULARES**

- Profa. Dra. Sara Terezinha Olala Saad
- Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
- Prof. Dr. Radovan Burojevic
- Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
- Profa. Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay



### **SUPLENTES**

- Prof. Dr. Mário José Saad
- Profa. Dra. Joyce Maria Anicchino Bizzachi

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido elaborado sem o auxílio de diversas pessoas e algumas entidades, às quais deixo os meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente, à Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora deste trabalho, pelo estímulo e valiosas sugestões indispensáveis à realização deste trabalho e do meu desenvolvimento científico, assim como pela amizade dedicada.

À Profa. Dra. Sara T.O. Saad, pela constante participação na realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório de CFU que me possibilitaram um ambiente saudável e harmonioso no decorrer das minhas atividades de doutoramento: Rita, Marlene, Márcia, Marize, Solange, Denise e Rafael.

À Elizabeth, pela amizade e coleta do material necessário a realização deste trabalho.

Ao Luís Fernando, pelo apoio, amor e atenção dedicados.

Às profissionais do Departamento de Comunicação Social e Informática do Hemocamp.

Ao Departamento de Fisiologia, que possibilitou a elaboração desta tese de doutoramento.

Aos professores do Departamento de Fisiologia, pela ampliação de meus conhecimento através das disciplinas ministradas.

Ao Hemocamp, pelo apoio financeiro, o qual foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Estatística da FCM, pelas análises realizadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

A muitas outras pessoas que me auxiliaram na realização deste trabalho e não estão aqui citadas.

## Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>i</b>
<b>I. Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>09</b>
<b>III. Casuística e métodos .....</b>	<b>11</b>
1. Casuística.....	12
2. Métodos .....	13
2.1. Crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea (CFU-C) .....	13
2.2. Apoptose celular.....	14
2.3. Expressão do proto-oncogene bcl-2.....	16
2.4. Análises Estatísticas.....	17
<b>IV. Resultados.....</b>	<b>18</b>
<b>V. Discussão .....</b>	<b>37</b>



<i><b>VI. Conclusões.....</b></i>	<i><b>44</b></i>
<i><b>VII. Summary .....</b></i>	<i><b>47</b></i>
<i><b>VIII. Referências bibliográficas.....</b></i>	<i><b>49</b></i>
<i><b>Apêndice.....</b></i>	<i><b>a</b></i>

*RESUMO*

---

Neste trabalho estudamos o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea, na ausência de fatores estimuladores de colônias (autoproliferação) em vinte e oito pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA), doze pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) e dezenove controles (indivíduos normais).

Os nossos resultados demonstraram que pacientes com LMA e SMD apresentam um aumento autócrino no número de colônias hematopoiéticas que é significativamente superior ao observado em indivíduos normais ( $p = 0.001$ ). Além disso, verificamos que a presença de autoproliferação celular está associada a um mau prognóstico nas leucemias agudas, pois os pacientes com autoproliferação celular ( $n = 15$ ) apresentaram uma sobrevida menor em relação aos pacientes com ausência de capacidade autoproliferativa ( $n = 13$ ), ( $p = 0.01$ ).

O estudo da sobrevida celular, realizado através da caracterização morfológica por microscopia óptica de células apoptóticas, revelou um baixo índice de células apoptóticas em pacientes com LMA ( $n = 18$ ,  $p = 0.001$ ) em relação aos controles. Por outro lado, pacientes com SMD apresentaram um alto índice de apoptose celular quando comparado aos indivíduos normais ( $n = 11$ ,  $p = 0.001$ ).

Em relação à expressão do proto-oncogene *bcl-2*, verificamos novamente resultados opostos entre os pacientes com LMA e SMD, pois observamos um alto índice de expressão do *bcl-2* em células mononucleares de pacientes com LMA

( $n = 28$ ,  $p = 0.002$ ) em relação aos controles, e um baixo índice de expressão do proto-oncogene *bcl-2* em células mononucleares de pacientes com SMD ( $n = 15$ ,  $p = 0.002$ ). Além disso, verificamos uma correlação linear negativa entre a expressão do proto-oncogene *bcl-2* e apoptose celular em pacientes com LMA ( $r_s = -0.664$ ;  $p < 0.001$ ). A elevada expressão do *bcl-2* verificada nos pacientes com LMA também indica uma interferência deste proto-oncogene na resposta celular à quimioterapia, pois sua expressão estava significativamente maior em pacientes refratários à quimioterapia ( $p = 0.03$ ).

Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de resistência celular à quimioterapia nos pacientes com LMA e também ajudam a esclarecer, pelo menos em parte, alguns processos envolvidos na hematopoiese desordenada nos casos de SMD.

## *I. INTRODUÇÃO*

---

Leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença neoplásica onde ocorre uma transformação maligna dos precursores hematopoiéticos. Desta forma, clones de células leucêmicas superam o crescimento de clones de células normais, principalmente glóbulos vermelhos, neutrófilos e plaquetas, resultando em uma predominância de células imaturas no tecido hematopoiético. Esta diminuição do crescimento e diferenciação de células normais aparece como causa principal das manifestações clínicas da doença (GALE & FOON, 1986), como a anemia, que é severa, persistente e freqüentemente requer inúmeras transfusões, a granulocitopenia, a qual aumenta a suscetibilidade às infecções e a trombocitopenia, a qual aumenta o risco de sangramento de tal forma que constitui uma ameaça à própria vida. Entretanto, anormalidades morfológicas e funcionais de neutrófilos e plaquetas, assim como alterações imunológicas, foram relatadas em portadores de LMA, indicando que as manifestações da doença podem não ser causadas unicamente pela redução do número de células normais (HERSH et al., 1971; MASON, 1977 e HENDERSON, 1990). Sendo assim, a sobrevida dos pacientes leucêmicos sem tratamento e pacientes não responsivos à quimioterapia é geralmente inferior a 2 meses e meio, com morte resultante de infecções e ou complicações hemorrágicas (TIVEY, 1955; HENDERSON, 1969 e CRIPE, 1997).

Na leucemogênese ocorrem alterações nos processos de crescimento, diferenciação e sobrevivência das células progenitoras hematopoiéticas. Estudos experimentais recentes indicam que muitos dos mecanismos que alteram este

crescimento, levando a uma proliferação celular autônoma, estão relacionados com a origem e progressão da leucemia mieloide aguda (ADKINS, LEUTZ & GRAF, 1984; METZ, GRAF & LEUTZ, 1991; SHERR, 1990 e HUNTER et al., 1993). Em estudos realizados em pacientes com LMA, observou-se uma proliferação autônoma e espontânea *in vitro* de blastos em cultura, resultante de uma estimulação autócrina (YOUNG & GRIFFIN, 1986, YOUNG, WAGNER & GRIFFIN, 1987; DELWEL et al., 1989).

O tratamento realizado em pacientes com LMA é feito com agentes quimioterápicos com o objetivo de induzir a remissão das células leucêmicas (RAI et al., 1981; KEATING, et al., 1982). As drogas utilizadas para induzir a remissão foram introduzidas na terapia das leucemias agudas em 1960, sendo elas a citosina arabinosídeo (ara-C), um antimetabólito análogo da pirimidina, e a tioguanina (6 tioguanina - 6TG), um antimetabólito análogo da purina. Estas drogas são compostos químicos artificiais, estruturalmente semelhantes aos compostos naturais, essenciais para a síntese de DNA. Desta forma, irão competir com os substratos naturais por suas enzimas, interferindo na síntese do DNA. Após 1970, foi acrescentado ao tratamento com ara-C e 6TG um antibiótico natural, isolado de uma espécie de *Streptomyces*, o daunorrubicina, sendo este regime de tratamento conhecido como *DAT regimen* (MANDELLI et al., 1978; WIERNIK et al., 1979). O tratamento quimioterápico realizado com estas três drogas apresenta sucesso na indução de remissão em cerca de 80% dos pacientes, sendo que em apenas 10 a 30% ocorre uma sobrevida livre da doença por mais do

que 5 anos. Vários fatores contribuem para a reincidência da doença e/ou resistência à quimioterapia (WINTROBE, 1981). Recentemente, LÖWENBERG et al. (1993) demonstraram que o insucesso no tratamento quimioterápico pode estar relacionado com uma proliferação autônoma *in vitro* de blastos. Estes autores observaram que pacientes com alto grau de proliferação celular apresentam um mau prognóstico, uma vez que a probabilidade de sobrevivência, assim como a de remissão completa após tratamento quimioterápico é significativamente menor do que em pacientes com pequeno grau de autoproliferação. Estes resultados sugerem que esta capacidade proliferativa autônoma, adquirida pelas células leucêmicas, está possivelmente associada a uma maior agressividade da LMA. Além disso, um outro aspecto que poderia contribuir para o insucesso do tratamento, aumentando a resistência das células leucêmicas à quimioterapia, está ligado à expressão do proto-oncogene *bcl-2*. O oncogene *bcl-2* foi isolado no ponto de quebra da translocação entre os cromossomos 14 e 18, encontrados em grandes proporções em linfomas de células B (TSUJIMOTO et al., 1984). *Bcl-2* é uma proteína da membrana mitocondrial que aparentemente inibe a apoptose celular (HOCKENBERY et al., 1991 e KORSMEYER, 1992). A sua contínua expressão parece exercer um papel direto na patogênese dos linfomas foliculares t(14:18) (VAUX, 1993). O *bcl-2* também se expressa intensamente em células mielóides não induzidas e tem sua expressão reduzida durante a diferenciação mielóide. Trabalhos recentes demonstram que a expressão deste proto-oncogene em precursores mielóides e em células pré-B contribui para o aumento da sobrevivência destas células na ausência de proliferação ou de fatores



de crescimento (VAUX, CORY & ADAMS, 1988). Em camundongos transgênicos, o aumento da expressão do *bcl-2* resulta em acúmulo de centros foliculares de células B aumentando o tempo de vida destas células *in vitro*, sem interferência no ciclo celular (MAcDONNELL et al., 1989 e KORSMEYER, 1992). A demonstração de que precursores mielóides normalmente morrem por apoptose (WILLIAMS et al., 1990) deixa claro que a expressão do *bcl-2*, inibindo a morte celular programada (apoptose) é um novo modelo de ação dos oncogenes (NUÑEZ et al., 1990). CAMPOS et al. (1993) observaram que células leucêmicas de pacientes com uma maior expressão do *bcl-2*, quando cultivadas em cultura, apresentam um tempo de vida superior às células de pacientes com uma menor expressão deste oncogene, sugerindo assim que a presença deste proto-oncogene interfere na resposta à quimioterapia através de bloqueio no processo de morte celular programada ou apoptose. A apoptose ocorre em estágios específicos do desenvolvimento, determinando a manutenção, o crescimento ou a involução dos tecidos, através da eliminação de células em excesso, pré-cancerosas ou lesadas (BURSCH, OBERHAMMER & SCHULTE-HERMANN, 1992). Este processo se dá através de uma série de alterações morfológicas que incluem condensação nuclear, degradação do DNA em fragmentos oligonucleossomais e, em alguns casos, é dependente da síntese de proteínas. Células apoptóticas são normalmente fagocitadas e removidas através dos neutrófilos (SAVILL et al., 1990). Este processo é essencial em muitas condições fisiológicas, como na seleção clonal do sistema imune (WILLIAMS, 1991). A apoptose pode ocorrer em resposta a hormônios glicoproteicos de timócitos imaturos, à falta de hormônios essenciais à

sobrevivência da célula (DUKE & COHEN, 1986), ou à ausência de fatores estimuladores de crescimento dos precursores hematopoiéticos (WILLIAMS et al., 1990). Da mesma forma, a apoptose pode ser induzida através de uma variedade de drogas citotóxicas utilizadas na terapia do câncer (BARRY, BEHMKE & EASTMAN, 1990). Diante do exposto, um dos objetivos deste trabalho foi correlacionar a expressão do proto-oncogene *bcl-2* e a proliferação celular autônoma com a resposta à quimioterapia, em pacientes com LMA. Realizamos também estes estudos em pacientes com síndrome mielodisplásica, como a anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) e anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREBt) (BENNETT et al., 1982), uma vez que 40 % dos casos de SMD evoluem para a LMA (KIKUKAWA, AOKI e MORI, 1996) e aproximadamente 20 a 40% morrem por infecções e ou complicações hemorrágicas. Em pacientes que apresentam menos de 5 % de blastos na medula óssea (AR ou ARSA), o potencial de evolução para LMA é menor quando comparado aos pacientes com 5 a 30 % de blastos (AREB ou AREBt) (BENNETT et al., 1982 e KOEFFLER, 1996). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na evolução da SMD para a LMA permanecem desconhecidos.

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) também é uma doença clonal dos precursores hematopoiéticos da medula óssea (ABRAHAMSON et al., 1991 e JOWITT, YIN & SAUNDERS, 1993). Entretanto, a hematopoiese normal parece estar presente na maioria dos casos (ANASTASI et al., 1993). Os sinais e

sintomas geralmente são diferentes dos da LMA, pois esta doença caracteriza-se por uma hematopoiese ineficiente, associada a alterações morfológicas das células medulares, a qual resulta em uma citopenia periférica refratária. Na SMD, duas ou mais linhagens hematopoiéticas são afetadas, uma vez que as alterações também ocorrem nas células pluripotentes da medula óssea (RAJAPAKSA et al., 1996). Neste sentido, MERCHAV et al. (1991) observaram um aumento no número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), colônias de precursores eritróides (BFU-E) e colônias de megacariócitos (CFU-GEMM) em pacientes com SMD, na presença de níveis elevados de fator de crescimento hematopoiético para granulócitos (G-CSF). Além disso, SCHIPPERIUS et al. (1990) verificaram um aumento no número e tamanho de colônias para granulócitos e macrófagos e de colônias de células eritróides, na presença de uma combinação de citocinas. Respostas similares foram observadas na presença do fator de crescimento para células pluripotentes “stem cell factor” (SCF) (SOLIGO et al., 1994, PIACIBELLO et al., 1994 e MAZE et al., 1993). Entretanto, mesmo com uma medula óssea normal ou hipercelular, *in vitro*, a maioria dos pacientes apresenta uma citopenia periférica refratária, conforme descrito anteriormente. Trabalhos recentes na literatura indicam que a morte celular precoce seria o principal aspecto que poderia contribuir para explicar este paradoxo. Neste sentido, RAZA et al. (1995) observaram um alto índice de apoptose celular em células estromais da medula óssea de pacientes com SMD sugerindo alterações de genes envolvidos no controle da morte celular programada, como a expressão do proto-oncogene *bcl-2*, já discutida nas leucemias. Entretanto, poucos trabalhos envolvendo o

estudo da expressão do *bcl-2* na SMD foram verificados na literatura (LEPELLEY et al., 1995 e RAJAPAKSA et al., 1996), e somente LUTTON et al., 1984 verificaram um crescimento celular autônomo de colônias de células eritróides em 3 pacientes com anemia sideroblástica idiopática adquirida. Além disso, nenhum trabalho envolvendo o estudo da expressão do proto-oncogene *bcl-2*, autoproliferação celular e apoptose em pacientes com SMD foi verificado na literatura. Neste sentido, torna-se clara a necessidade de estudos adicionais envolvendo a expressão do proto-oncogene *bcl-2* e a resposta hematopoiética na SMD, uma vez que os mecanismos envolvidos na hematopoiese ineficiente são desconhecidos até o presente momento.

Outro aspecto importante a ser considerado, é que a indução da proliferação celular em vários casos de SMD tem desencadeado a diferenciação destas células em células leucêmicas (PIETSCH et al., 1992; MAZE et al., 1993 e IKEDA et al., 1993), sugerindo que as alterações clonais da SMD e LMA sejam semelhantes. Além disso, a dificuldade de diagnóstico que ocorre em muitos casos de SMD (KOEFFLER, 1996 e KOUIDES & BENNETT, 1996) requer o estudo de novos parâmetros que poderiam servir como indicadores da SMD nos casos de difícil caracterização desta anomalia.

## *II. OBJETIVOS*

---

Os objetivos deste trabalho consistiram em:

1. Avaliar a autoproiferação celular e a expressão do proto-oncogene *bcl-2* em pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e síndrome mielodisplásica (SMD).
2. Realizar o estudo de correlações entre a autoproiferação celular e a expressão do proto-oncogene *bcl-2* nas duas doenças.
3. Correlacionar a autoproiferação celular e a expressão do *bcl-2* com a sobrevida dos pacientes com LMA.

### *III. CASUÍSTICA E MÉTODOS*

---



## *1. Casuística:*

Neste trabalho, o estudo da autoproliferação celular foi realizado em vinte e oito pacientes com LMA, doze pacientes com SMD (dez pacientes com AR, um paciente com ARSA e um paciente com AREBt), assim como, dezenove indivíduos normais, doadores de medula óssea para transplante no Hospital das Clínicas da UNICAMP. A expressão do proto-oncogene *bcl-2* foi realizada em vinte e oito pacientes com LMA, quinze pacientes com SMD, assim como, quinze indivíduos normais. O estudo da apoptose celular foi realizado em dezoito pacientes com LMA, onze pacientes com SMD e onze indivíduos normais. Todos os pacientes, após informados, concordaram com a realização deste estudo. A avaliação da sobrevida foi feita por um período de 180 dias.



## *2. Métodos:*

### *2.1 Cultura clonal dos precursores hematopoiéticos da medula óssea (CFU-C):*

Após obtenção da medula óssea com anti-coagulante (heparina), as células foram centrifugadas em Ficoll-Hypaque por 25 minutos a 1500 rpm, lavadas três vezes em meio RPMI-1640 (Sigma) e ressuspensas a uma concentração final de  $2,5 \times 10^5$  células/ml em meio contendo: 30% de meio IMDM (Difco) 2 x concentrado, 50 % de ágar (0,6%) e 20 % de soro bovino fetal.

Para o estudo da autoproiferação celular, as células ressuspensas no meio descrito acima foram distribuídas em volumes de 2 ml em cada placa de petri, na ausência de estímulos exógenos. Realizou-se este estudo em duplicata para cada paciente. As culturas foram incubadas por 14 dias a 37°C em presença de 5% de CO<sub>2</sub> no ar. Após este período, contou-se o número de colônias em microscópio de dissecção com aumento de 40 x (METCALF, 1984). O número de colônias obtido foi ajustado de acordo com a celularidade da medula óssea de cada paciente. Para estudo morfológico, as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5 % (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/Hematoxilina.

## *2.2 - Avaliação da sobrevida celular (apoptose):*

### *2.2.1 Padronização do estudo da apoptose celular com células da medula óssea de indivíduos normais:*

Após obtenção da medula óssea em anti-coagulante (heparina) as células foram centrifugadas em Ficoll-Hypaque por 25 minutos a 1500 rpm, lavadas três vezes em meio RPMI e ressuspensas a uma concentração final de  $5 \times 10^5$  células/ml em meio RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina e 20 % de soro bovino fetal. A seguir, incubou-se esta suspensão de meio mais células a 37°C em presença de 5% de CO<sub>2</sub> no ar, sendo o meio suplementado renovado no sétimo dia de incubação com o objetivo de manter-se os nutrientes necessários às células em cultura. As células hematopoiéticas foram removidas da cultura líquida no oitavo, décimo e décimo-quarto dias após o início dos ensaios. A seguir, as células foram lavadas três vezes e diluídas a uma concentração de  $5 \times 10^6$  células/ml. Diluiu-se esta suspensão de células em tampão TBS (10ml). Logo após, realizou-se o citospin com 500 ul da suspensão celular em cada suporte citológico através de centrifugação por 5 minutos a 800 rpm. No dia seguinte, as lâminas foram coradas com Leishman, e determinou-se a sobrevida celular através do aspecto morfológico das células em cultura (microscopia óptica, aumento de 400x). Utilizou-se como padrão para determinação da apoptose a condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de núcleos picnóticos, uma vez que estas são as principais características da apoptose celular descritas na literatura

(WYLLIE, KERR & CURRIE, 1980; BAXTER et al., 1989; FESUS, DAVIES & PIACENTINI, 1991; SCHWARTZMAN & CIDLOWSKI, 1993 e KOSHIDA, SAEGUSA & OKAYASU, 1997).

### *2.2.2 - Fragmentação nuclear (apoptose):*

Realizou-se a extração do DNA das células mantidas em cultura líquida, da seguinte maneira: As células foram lavadas através de centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm. Ressuspendeu-se o sedimento de células em solução contendo NaCl 5 M; EDTA 0,2 M; Tris-HCl 2 M, pH 7,5. Incubou-se esta solução até o dia seguinte quando realizou-se a extração do DNA (três extrações) com uma solução de clorofórmio/álcool isonílico (24:1). Adicionou-se 10% do volume original de acetato de sódio 3 M e precipitou-se o DNA com álcool 70 % (- 20° C). Secou-se ao ar por 5 minutos e ressuspendeu-se em solução tampão a 4° C (MARTIN, BRADLEY & COTTER, 1990).

### *2.2.2 - Eletroforese em gel de agarose:*

A eletroforese do DNA em gel de agarose a 1 %, 6V por cm de gel foi realizada em 2 mmol/l EDTA; 89mmol/l Tris-HCl; 89 Mmol/l ácido bórico, pH 8,0. Após completa eletroforese, visualizou-se o DNA em ultra violeta. O padrão eletroforético utilizado foi o de ausência de bandas descrito por COHEN, (1994).

## 2. 3 - Expressão do proto-oncogene *bcl-2*:

A medula óssea dos pacientes com LMA e SMD, obtida por aspiração em heparina foi diluída em meio RPMI e a seguir realizou-se gradiente em Ficoll-Hypaque através de centrifugação por 30 minutos a 1500 rpm. As células foram lavadas três vezes através de centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm. A seguir, foram diluídas em 20 ml de tampão TBS uma concentração de  $5 \times 10^6$  células (concentração final de  $2,5 \times 10^5$  células/ml). Realizou-se o citospin colocando-se 500  $\mu$ l em cada suporte de filtro citológico centrifugando-se por 5 minutos a 800 rpm.

No dia seguinte, as lâminas foram fixadas em acetona gelada por 10 minutos e hidratadas com tampão TBS. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pela incubação das lâminas com soro suíno por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário (*bcl-2* - Dako) por 2 horas, anticorpo biotinilado (Mult-link) por 45 minutos e complexo ABC (Strept ABCComplex/AP) por 45 minutos. Logo após, realizou-se a coloração com substrato cromógeno, que consiste de: fast red (10mg), levamisole (2,4mg) em tampão naphthol ASMX fosfato, 02 ml de N,N-dimetilformamida, 9,8 ml de tampão Tris HCl 0,1 M (pH 8,2). Contracorou-se com Hematoxilina de Mayer e água amoniacal por alguns segundos. As lâminas foram montadas com *coverslip* para leitura em microscopia óptica. Determinou-se a percentagem de células mononucleares com expressão do proto-oncogene *bcl-2* pela contagem de pelo menos 300 células por paciente (MAUNG et al., 1994).

## 2.4 - Análises Estatísticas

Utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para comparar a resposta autoproliferativa, expressão do proto-oncogene *bcl-2* e apoptose celular entre os pacientes com LMA, SMD e controles. Para o estudo de correlação entre os parâmetros estudados utilizou-se o teste não paramétrico de Spearman. Realizou-se a curva de sobrevida (período de avaliação de 180 dias) dos pacientes com LMA através do método descrito por KAPLAN & MEIER, (1958) e a comparação entre os grupos (autoproliferação x ausência de autoproliferação) foi realizada pelo teste de Log-Rank (procedimentos não paramétricos) (COLLET, 1994).

#### ***IV. RESULTADOS***

---

# *1. Crescimento e Diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea (CFU-C):*

## *1.1 Autoproliferação celular:*

Estudou-se o crescimento e diferenciação de progenitores hematopoiéticos da medula óssea, na ausência de estímulos, de vinte e oito pacientes com LMA, doze pacientes com SMD e dezenove controles, (tabela 1, 2 e 3, respectivamente).

Nossos resultados demonstraram a presença de autoproliferação celular em ambas as doenças. Pacientes com LMA e SMD apresentam um número de colônias superior aos indivíduos normais ( $p = 0.001$  – Wilcoxon, figuras 1 e 2, respectivamente). Além disso, as análises estatísticas demonstraram que a presença de autoproliferação celular está relacionada a um mau prognóstico na LMA, pois, conforme podemos verificar na figura 3, a sobrevida dos pacientes pertencentes ao grupo com autoproliferação celular apresentou-se reduzida em relação ao grupo com resposta hematopoiética semelhante aos controles ( $p = 0.01$ , teste de Log-Rank, curva de KAPLAN & MEIER, 1958).

A figura 4 apresenta o aspecto de uma cultura clonal de um paciente com SMD, fixada com glutaraldeído e corada com hematoxilina de Harry's.

## 2. *Apoptose celular*

Padronizou-se o estudo da apoptose celular com medula óssea de sete indivíduos normais. A média de percentagem de apoptose celular obtida nestes indivíduos foi de 25,2 %, 43,1% e 75,2 %, quando as células foram removidas da cultura líquida no oitavo, décimo e décimo quarto dia de incubação, respectivamente e caracterizadas microscopicamente (tabela 4). A figura 5 apresenta o aspecto microscópico de células apoptóticas utilizado neste estudo. A análise da fragmentação nuclear foi realizada com o “pool” de células obtido dos sete indivíduos descritos acima no décimo quarto dia de incubação. A figura 6 apresenta a fragmentação nuclear obtida nesta padronização proveniente do alto índice de apoptose celular obtido neste dia (75,2%). Resolvemos então padronizar o décimo dia de incubação para a realização da contagem das células apoptóticas nos pacientes com LMA e SMD, uma vez que a percentagem de células apoptóticas obtida neste dia foi de 43,1%. Esta contagem foi realizada através de microscopia óptica, uma vez que esta metodologia não exige uma grande concentração celular, como é o caso da extração do DNA. Efetuou-se este estudo em dezoito pacientes com LMA (tabela 5), onze pacientes com SMD (tabela 6) e 11 indivíduos normais, (sete destes controles são os mesmo apresentados na tabela 4) (tabela 7). Além disso, realizamos a extração do DNA celular em 4 pacientes com LMA, nos quais obteve-se uma concentração celular suficiente no décimo dia de cultura líquida (figura 7). Observamos com a extração do DNA uma



ausência de fragmentação nuclear proveniente do baixo índice de apoptose celular apresentado por estes pacientes através da microscopia óptica (figura 7).

Observamos neste estudo, resultados opostos entre as doenças estudadas, ou seja, ocorreu uma maior percentagem de células apoptóticas em pacientes com SMD em relação aos controles ( $p = 0.001$  - Wilcoxon, figura 8), enquanto que o número de células apoptóticas em pacientes com LMA apresentou-se reduzido em relação aos indivíduos normais ( $p = 0.001$  - Wilcoxon, figura 9). A figura 10 apresenta o aspecto microscópico de células de pacientes com SMD e LMA, respectivamente, após dez dias em cultura líquida. Pode-se verificar nestas figuras o alto índice de apoptose celular nas mielodisplasias em contraste ao baixo índice de apoptose observado nas leucemias.

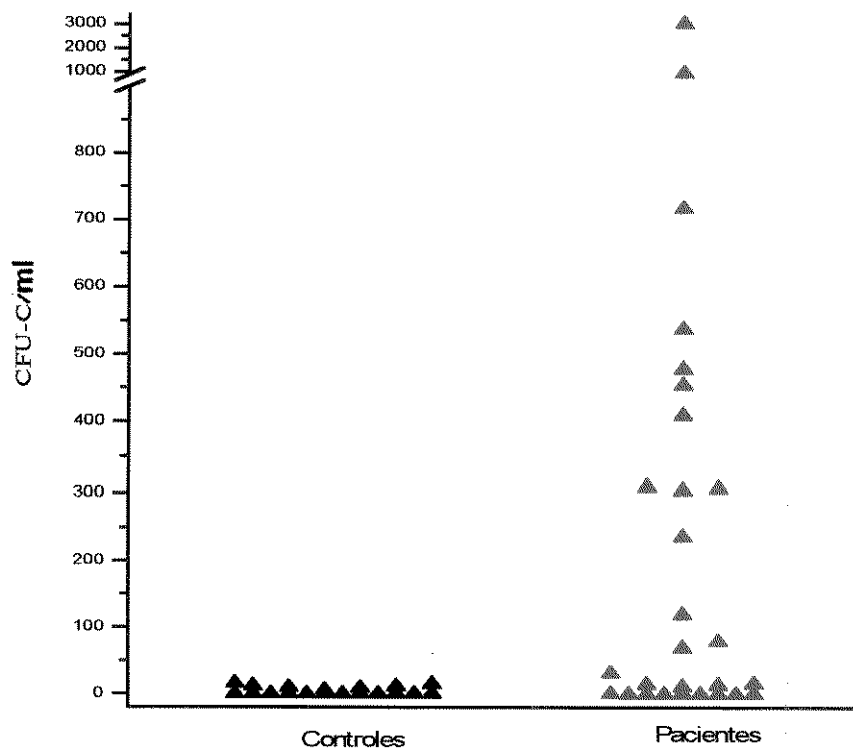
### 3. Expressão do proto-oncogene *bcl-2*

Realizou-se o estudo da expressão do proto-oncogene *bcl-2* em células mononucleares de vinte e oito pacientes com LMA (tabela 8), quinze pacientes com SMD (tabela 9) e quinze controles (tabela 10). Observamos novamente resultados opostos entre as doenças estudadas. Verificou-se um aumento significativo no número de células mononucleares expressando o proto-oncogene *bcl-2* em pacientes com LMA em relação aos controles ( $p = 0.002$ , Wilcoxon, figura 11). Por outro lado, houve uma diminuição significativa na expressão deste proto-oncogene nas células mononucleares dos pacientes com SMD em relação aos indivíduos normais ( $p = 0.002$ - Wilcoxon, figura 12). A figura 13 mostra o

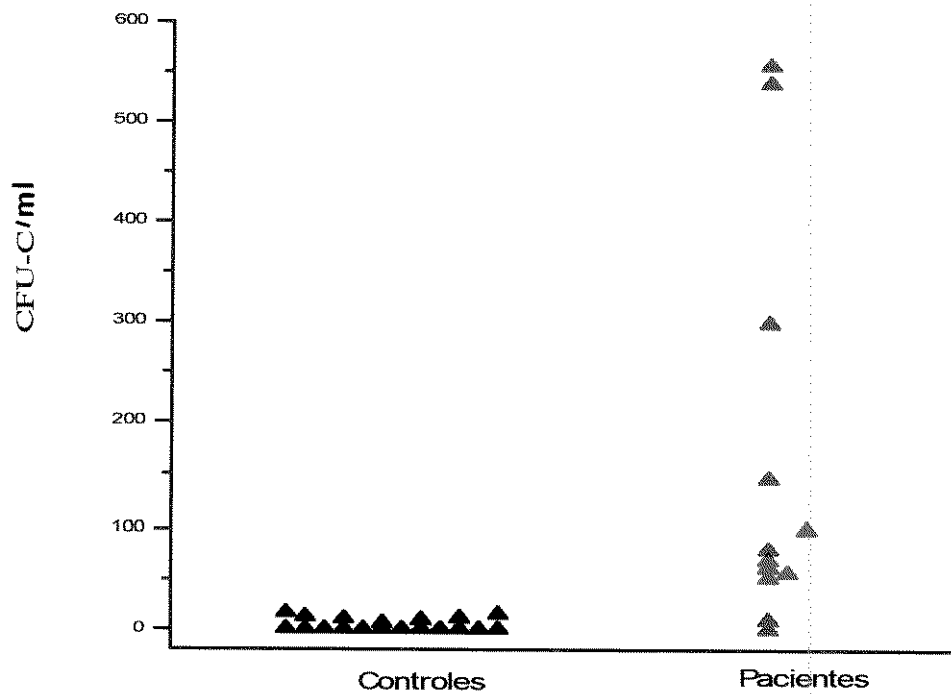
aspecto microscópico de células de pacientes com LMA com elevado índice de expressão do proto-oncogene *bcl-2*.

Observamos uma correlação linear negativa entre a percentagem de células mononucleares com expressão do *bcl-2* e a percentagem de apoptose celular nos pacientes com LMA ( $n = 18$ ,  $r_s = -0.664$ ,  $p < 0.001$ , Spearman's Rank Correlation, tabela 11, figura 14). Além disso, verificou-se também neste estudo, um maior número de células com expressão do *bcl-2* em pacientes leucêmicos refratários à quimioterapia em relação aos pacientes responsivos ( $p = 0.03$  – Wilcoxon, tabela 12).

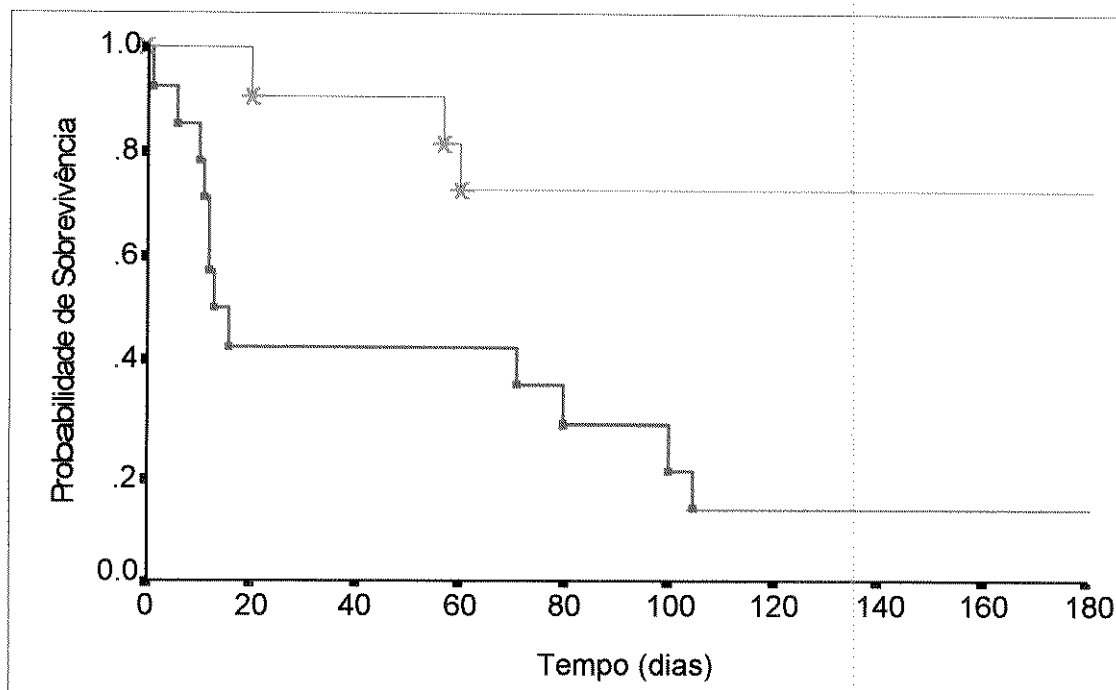
Não verificamos correlação linear entre os seguintes parâmetros avaliados: classificação FAB, idade, autoproliferação celular e expressão do *bcl-2* nas leucemias e mielodisplasias. O estudo de correlação entre expressão do *bcl-2* e a apoptose celular não foi realizado nos pacientes com SMD, uma vez que as células destes pacientes encontravam-se em avançado estágio de morte celular no décimo dia de cultura líquida, conforme apresentado na figura 10.



**Figura 1** – Número de colônias de precursores hematopoiéticos da medula óssea de pacientes com LMA (n = 28) e indivíduos normais (n=19) na ausência de estímulos exógenos (autoproliferação), ( $p = 0.001$ -Wilcoxon).

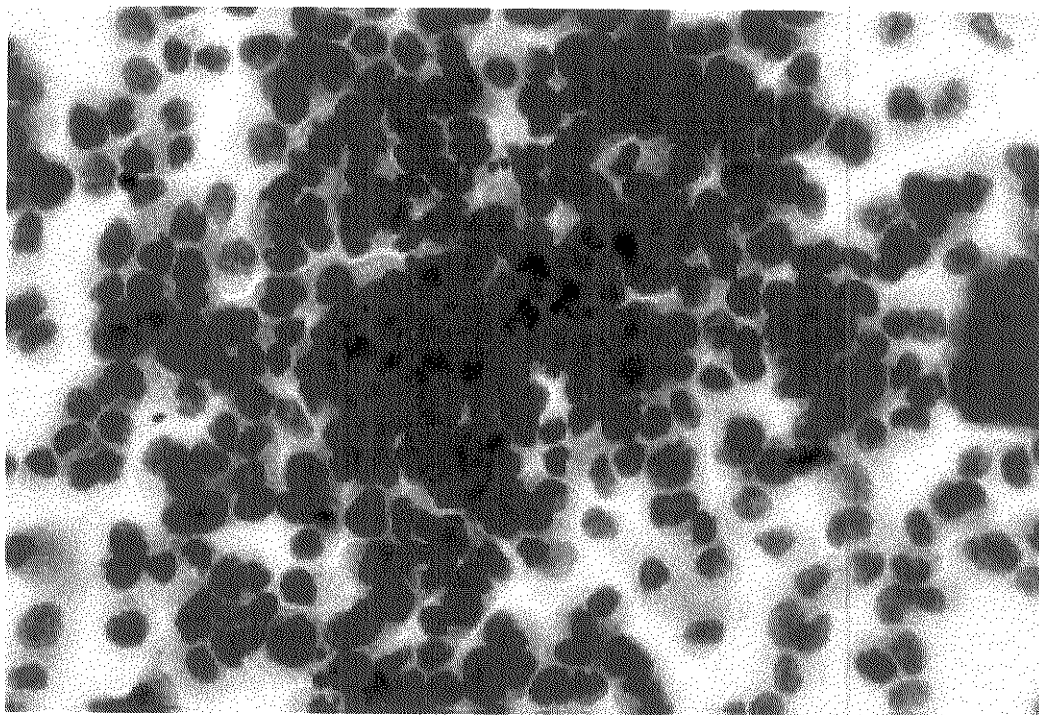


**Figura 2** – Número de colônias de precursores hematopoiéticos da medula óssea de pacientes com SMD (n= 12) e indivíduos normais (n = 19), na ausência de estímulos exógenos (autopoliferação), ( $p = 0.001$  – Wilcoxon).

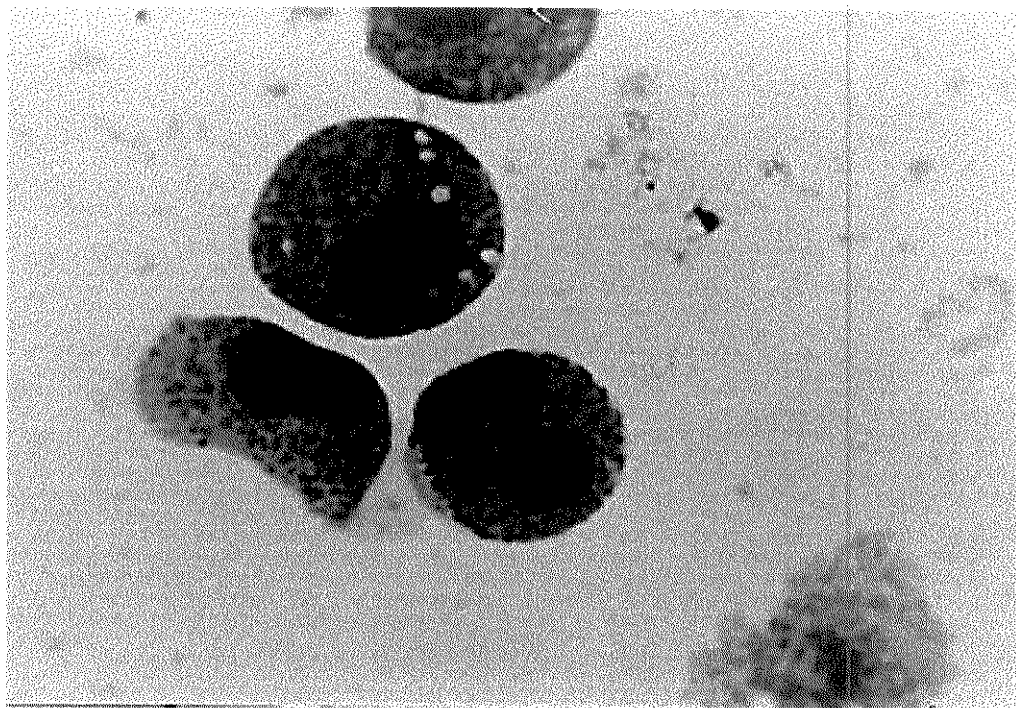


**Figura 3** - Curva de sobrevida de pacientes com LMA que apresentaram autoproliferação celular (□) (n= 15) e pacientes com ausência de capacidade autoproliферativa (n= 13) (\*), (Curva de Kaplan & Meier,  $p = 0.01$ , Log-Rank Teste).

**Figura 4** – Aspecto microscópico de uma colônia de precursores hematopoiéticos obtida no estudo da autoproliferação celular em pacientes com LMA (aumento 400 x)



**Figura 5** – Aspecto microscópico de células apoptóticas de indivíduos normais após 14 dias em cultura líquida. Padrão utilizado no estudo da apoptose celular (imersão, aumento de 1000 x)



**Figura 6** – Fragmentação do DNA de um “pool” de células da medula óssea de indivíduos normais após 14 dias em cultura líquida

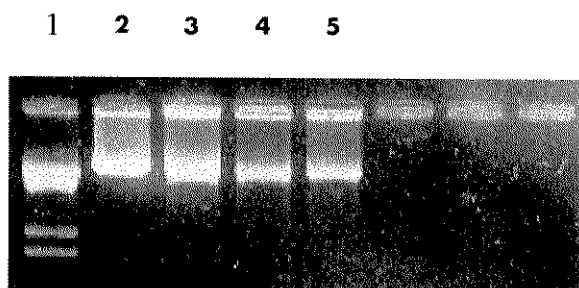


Banda 1 - Fragmentação do DNA ( 75,2 % de células apoptóticas)

Banda 2 – Marcador



**Figura 7** – Ausência de fragmentação do DNA de células da medula óssea de pacientes com LMA após dez dias em cultura líquida



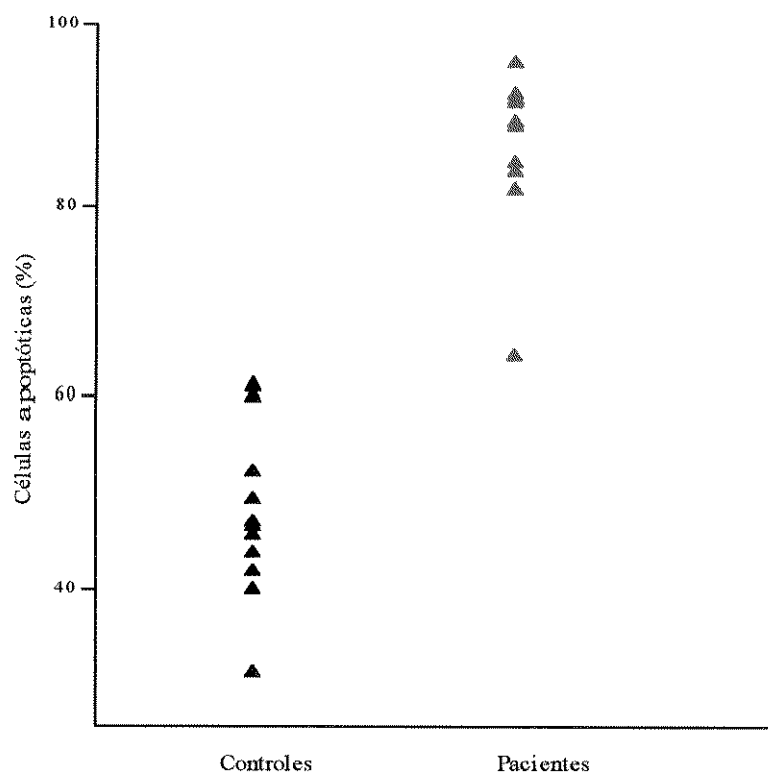
Banda 1 – Marcador

Banda 2 – paciente com 3,9 % de células apoptóticas

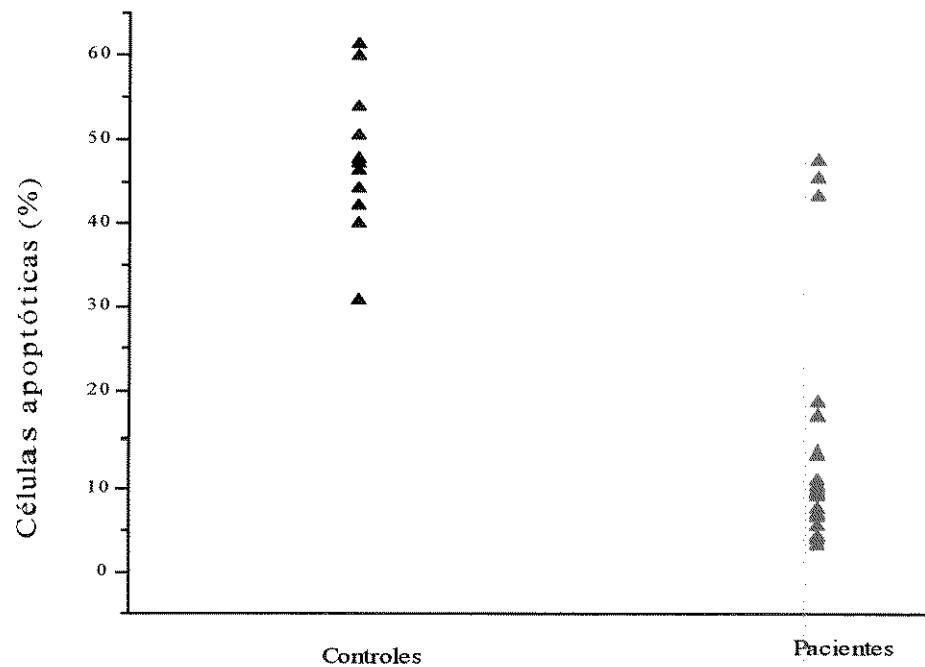
Banda 3 - paciente com 11,0 % de células apoptóticas

Banda 4 - paciente com 7,1 % de células apoptóticas

Banda 5 - paciente com 5,5 % de células apoptóticas

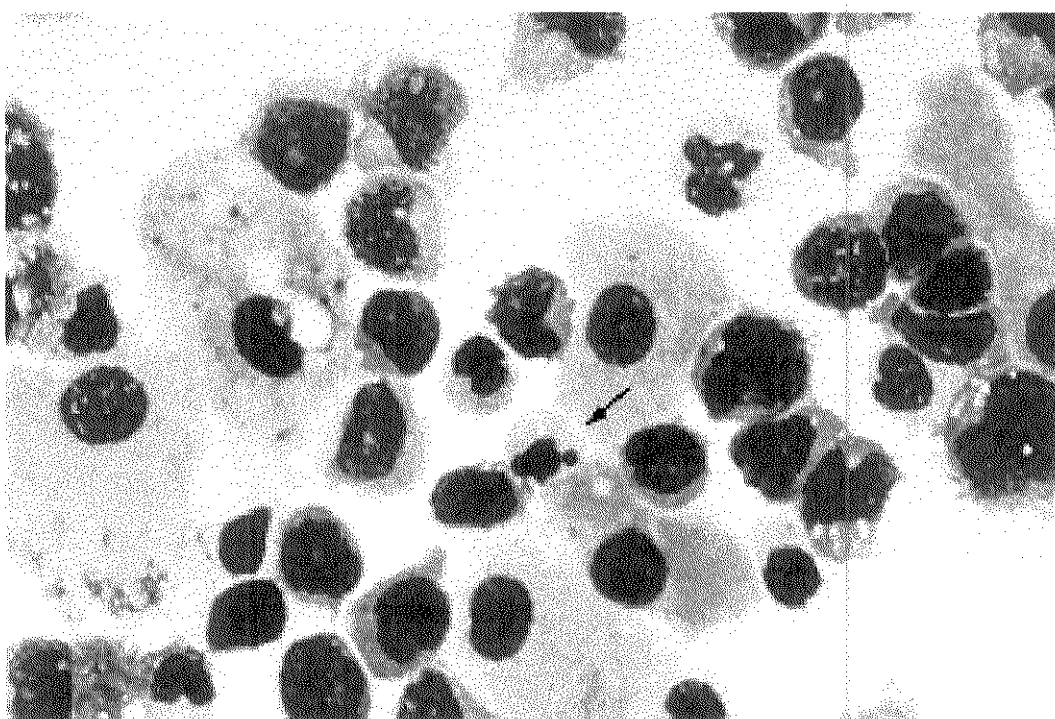
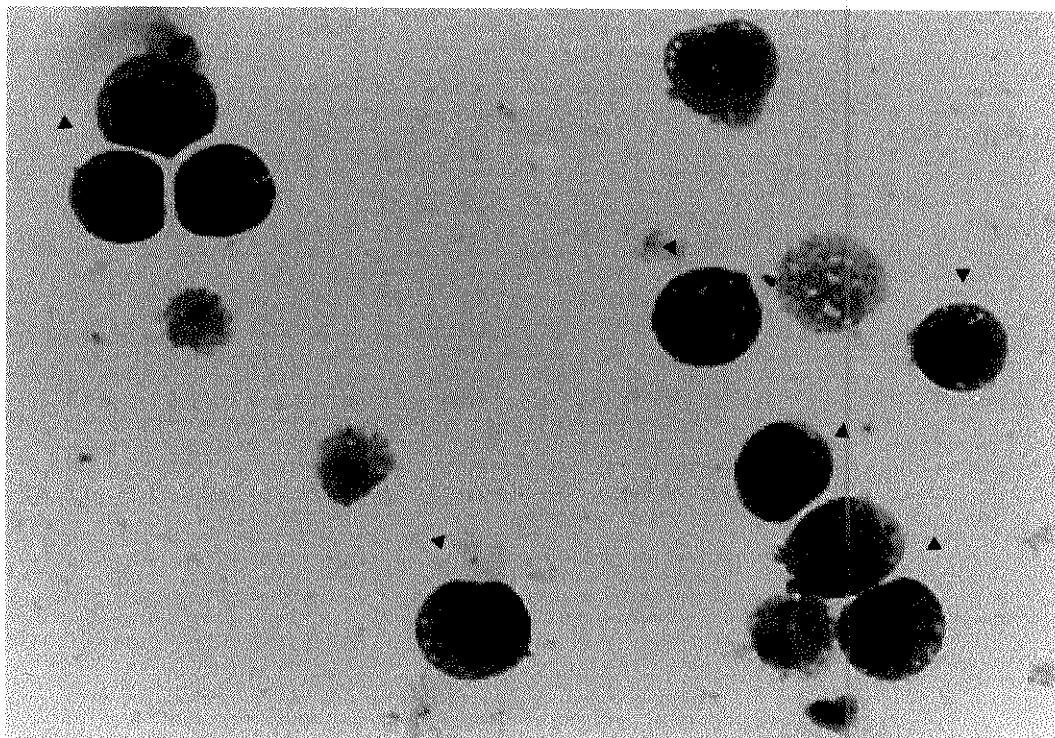


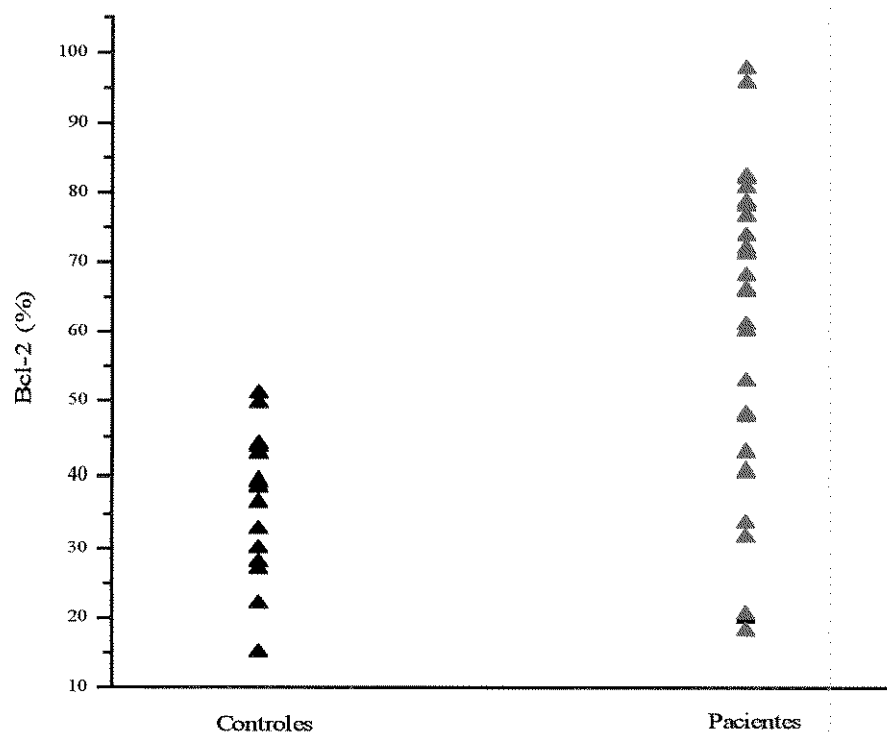
**Figura 8** - Percentagem de células apoptóticas obtida de pacientes com SMD e indivíduos normais, no décimo dia de incubação em cultura líquida ( $p = 0.001$  – Wilcoxon).



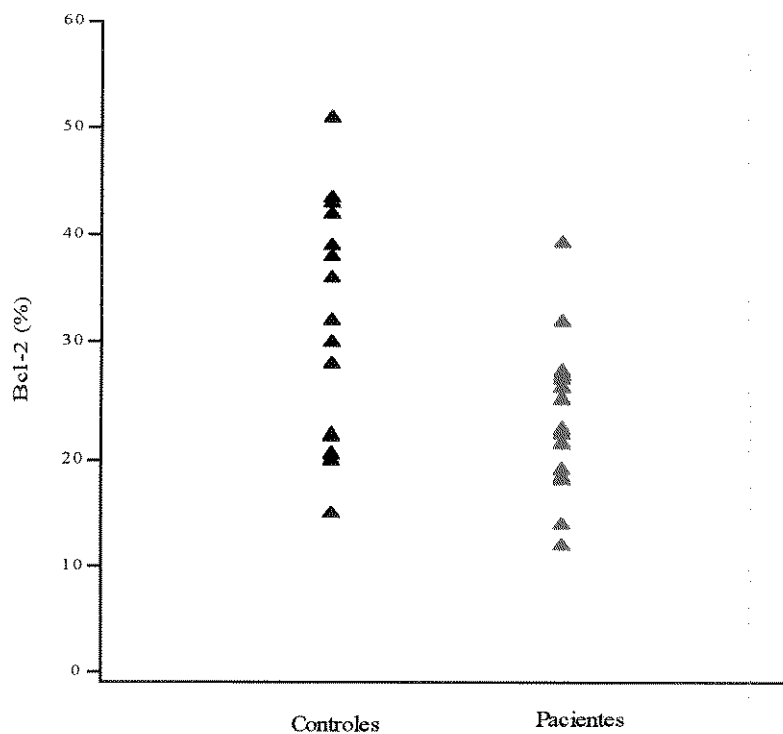
**Figura 9** - Percentagem de células apoptóticas obtida de pacientes com LMA (n = 18) e indivíduos normais (n = 11), no décimo dia de incubação em cultura líquida (p = 0.001 – Wilcoxon).

**Figura 10** – Aspecto microscópico de células apoptóticas de indivíduos com SMD e LMA, respectivamente, após dez dias em cultura líquida (aumento 400x)



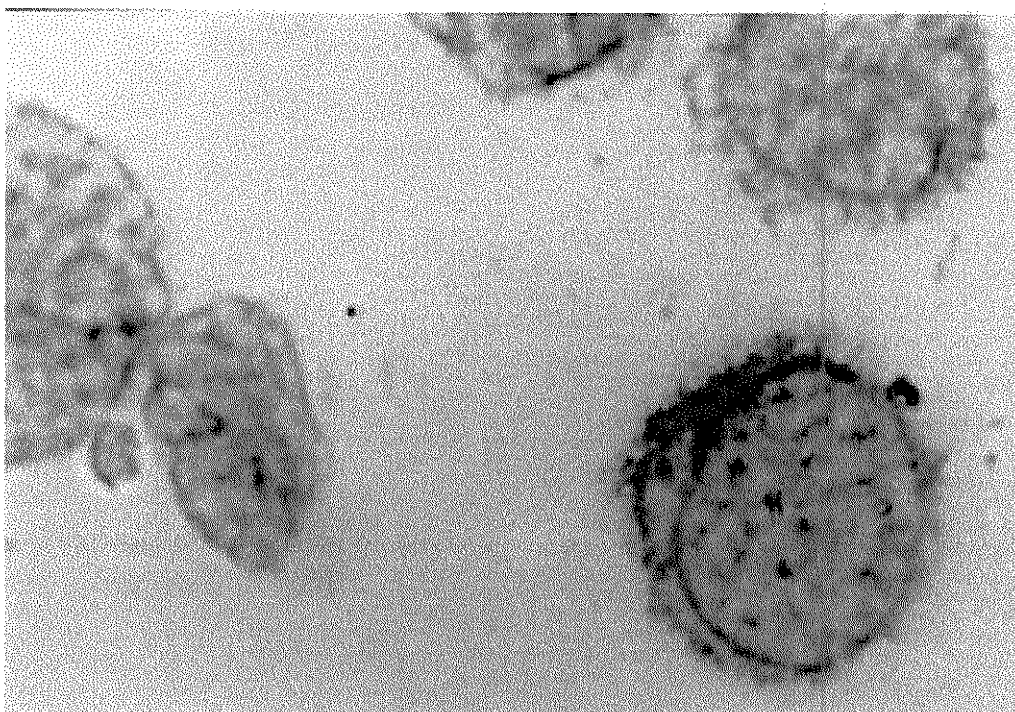
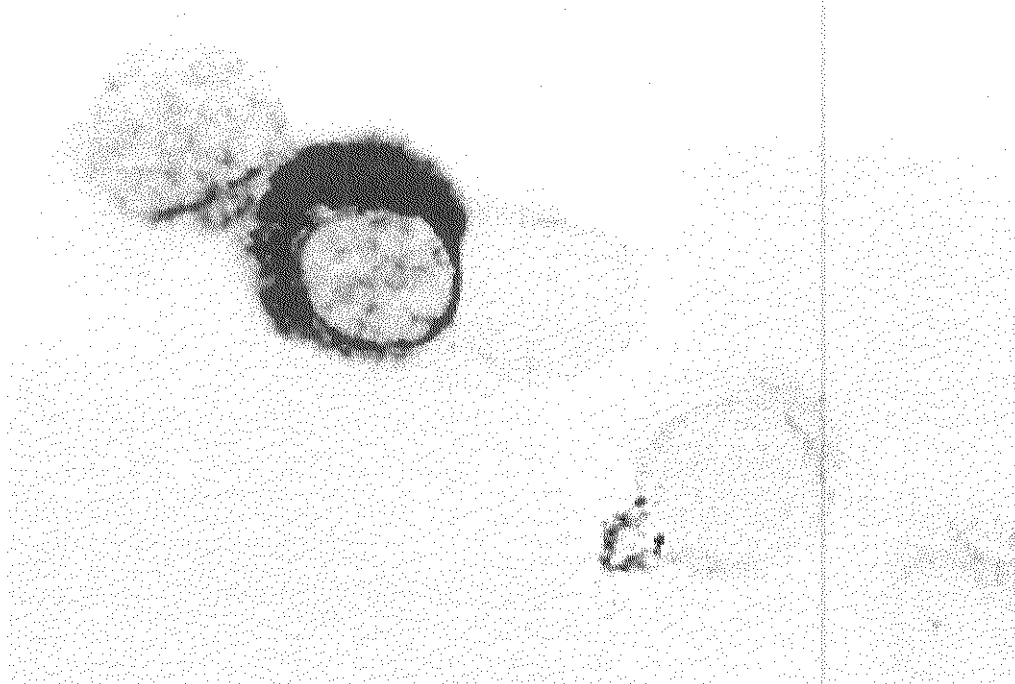


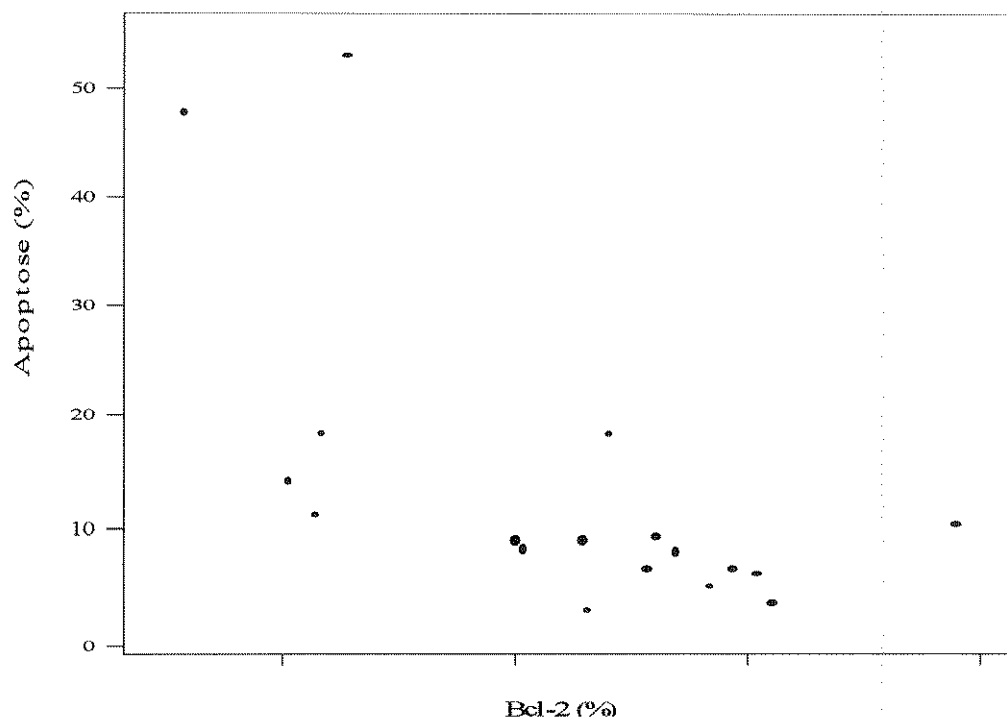
**Figura 11** - Percentagem de células mononucleares com expressão do proto-oncogene *bcl-2* em pacientes com LMA (n = 28) e indivíduos normais (n = 15), (p = 0.002 – Wilcoxon).



**Figura 12** - Percentagem de células mononucleares com expressão do proto-oncogene *bcl-2* em pacientes com SMD e indivíduos normais (n = 15, p = 0.002 – Wilcoxon).

**Figura 13** – Aspecto microscópico da expressão do proto-oncogene *bcl-2* em células mononucleares de pacientes com LMA (aumento 1000x)





**Figura 14** - Correlação linear negativa entre a percentagem de células mononucleares com expressão do proto-oncogene *bcl-2* e a percentagem de células apoptóticas obtida no décimo dia de cultura líquida, em pacientes com LMA ( $n = 18$ ,  $r = - 0.664$ ;  $p < 0.001$ , Spearman's Rank Correlation).



## *V. DISCUSSÃO*

---

A proliferação de células leucêmicas em humanos é geralmente estimulada por fatores de crescimento hematopoiéticos exógenos. Porém, em muitos casos, as células leucêmicas apresentam níveis acentuados de crescimento autônomo *in vitro*. Estas células são capazes de produzir e liberar fatores de crescimento que lhes conferem capacidade autócrina (YOUNG et al., 1986, COZZOLINO et al., 1989 e OSTER et al., 1989). Neste sentido, a liberação autócrina destes fatores de crescimento pode contribuir para o aumento no número de colônias de precursores hematopoiéticos (CFU-C) em pacientes com LMA, mesmo na ausência de estímulos, conforme observado em nossos estudos. Além disso, verificamos também que a presença de autoproliferação celular está associada a um mau prognóstico nas leucemias, uma vez que a sobrevida do grupo de pacientes que apresentou autoproliferação foi reduzida em relação ao grupo com ausência de capacidade autoproliferativa. Um fator importante que poderia contribuir para explicar este resultado é que o aumento da expansão clonal das células leucêmicas *in vivo*, pode favorecer a frequência de mutações adicionais, contribuindo para a resistência quimioterápica (LÖWENBERG et al., 1993). Este aumento anormal na expansão clonal pode ainda desencadear alterações nos processos de crescimento, diferenciação e/ou morte celular. Neste sentido, observamos também neste estudo, um alto índice de expressão do proto-oncogene *bcl-2* em pacientes leucêmicos, o qual foi negativamente correlacionado com a percentagem de apoptose celular. Estes resultados sugerem a participação de um sinal anti-apoptose derivado da alta expressão do proto-oncogene *bcl-2* resultando em uma baixa percentagem de morte celular. Além disso, observamos um aumento significativo na expressão do

proto-oncogene *bcl-2* no grupo de pacientes refratários ao tratamento quimioterápico em relação ao grupo responsivo. Estes achados corroboram os divulgados por MAUNG et al. (1994). A baixa expressão do gene supressor de tumores *p53*, observada em pacientes leucêmicos, em estudos paralelos realizados em nosso laboratório, pode contribuir para explicar a elevada expressão do proto-oncogene *bcl-2* observada nos nossos pacientes leucêmicos. Dados na literatura demonstram que o *p53* apresenta uma ação reguladora na expressão do proto-oncogene *bcl-2* (MIYASHITA et al., 1994, HALDAR et al., 1994 e LEPELLEY et al., 1995). Alguns autores sugerem que a expressão do proto-oncogene *bcl-2* pode também ser regulada através do fator de crescimento hematopoiético para granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (BRADBURY et al., 1994, 1995 e 1997 e RUSSELL et al., 1995) produzido de forma autócrina pelas células leucêmicas com capacidade autoproliferativa aumentada. De acordo com os autores citados acima, a produção autócrina do GM-CSF pelas células leucêmicas aumenta a expressão do proto-oncogene *bcl-2*, o qual contribui para a resistência destas células à quimioterapia. Além da ação do GM-CSF produzido de forma autócrina pela células leucêmicas, alguns autores sugerem também a participação de outros fatores de crescimento na presença da autoproliferação celular em pacientes com LMA (COZZOLINO et al., 1989, TOSATO & JONES, 1990). De acordo com estes autores, células de pacientes leucêmicos com capacidade autoproliferativa aumentada liberam também interleucina 1 (IL-1), fator de crescimento hematopoiético para granulócitos (G-CSF) ou interleucina 6 (IL-6), sugerindo a participação de um múltiplo circuito autócrino dentro de um único clone maligno

(LANG & BURGUESS, 1990). IL-1 apresenta uma ação reguladora na hematopoiese através de efeitos sinérgicos com outros fatores de crescimento, possivelmente desencadeando um aumento na expressão de receptores para os fatores de crescimento hematopoiético (MOCHIZUKI et al., 1987 e BARTELMEZ et al., 1989). Consequentemente, um aumento na proliferação de células precursoras da medula óssea é observado. Além disso, a produção autócrina de IL-1 pelas células leucêmicas suporta o crescimento das mesmas e mantém a síntese autócrina de G-CSF e GM-CSF, os quais possivelmente contribuem para a presença de autoproliferação celular e aumento da expressão do proto-oncogene *bcl-2*. IL-1 parece apresentar um papel hierárquico em cada um destes circuitos de produção autócrina de fatores de crescimento. Neste sentido, RAMBALDI et al. (1991) verificaram que o bloqueio da interação entre a IL-1 e as células leucêmicas, através da neutralização da atividade da IL-1 ou através de uma interrupção na ligação da IL-1 aos seus receptores, resulta em uma interrupção destes circuitos autócrinos e consequentemente em alterações no processo de crescimento e diferenciação celular.

A produção autócrina de fatores de crescimento e interleucinas também pode desencadear a ativação de processos intracelulares específicos, tais como a transcrição de genes e tradução de proteínas. De acordo com GOUILLEUX-GRUART et al. (1996), a ativação da família de fatores de transcrição STAT1, STAT3 e STAT5 ocorre nas leucemias e os autores sugerem a participação destes fatores de transcrição na processo de leucemogênese. Sendo assim, estratégias

para suprimir a autoproiferação celular e expressão do proto-oncogene *bcl-2* nas leucemias podem contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos de tratamento. Uma delas seria o uso de um antagonista recombinante para os receptores da IL-1, o qual iria inibir o crescimento celular autônomo e a produção do GM-CSF (RAMBALDI et al., 1991 e ESTROV et al., 1992). Além disso, um maior número de estudos sobre o papel dos fatores de transcrição nas leucemias poderia contribuir para um maior entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta doença.

Resultados similares aos obtidos no estudo da autoproiferação celular nas leucemias foram observados nas mielodisplasias, onde verificamos também índices variados de capacidade autoproifiativa. Porém no estudo da expressão do proto-oncogene *bcl-2* e da percentagem de apoptose celular, verificamos resultados opostos. A expressão do proto-oncogene *bcl-2* apresentou-se reduzida e a percentagem de apoptose celular apresentou-se significativamente aumentada. Este aumento na capacidade autoproifiativa nas mielodisplasias também sugere a liberação de fatores de crescimento hematopoiético autócrinos. Entretanto, dados na literatura indicam que nas mielodisplasias os fatores de crescimento hematopoiético encontram-se em níveis normais, como é o caso da eritropoietina (JACOBS et al., 1989), ou reduzidos, como é o caso do GM-CSF (BRADBURY et al., 1995 e SHETTY et al., 1996), sugerindo a presença de outros mecanismos envolvidos na autoproiferação celular nesta doença. Neste sentido, SOLIGO et al. (1996) relataram um aumento no número de receptores para GM-CSF e para o

fator *stem cell* (c-kit) nas mielodisplasias, os quais poderiam contribuir para um aumento na sensibilidade celular, conferindo um crescimento anormal, *in vitro*, destas células, mesmo na presença de níveis normais ou reduzidos de fatores de crescimento hematopoiético. Além disso, HOEFSLOOT et al. (1997) reportaram uma ativação normal do STAT5 nestes pacientes. Sendo assim, alterações em genes que controlam o processo de proliferação e ou morte celular, tais como *c-myc* oncogene (NOWAK, 1992 e RAJAPAKSA et al., 1996) ou na proteína p21 ras (SILVA et al., 1997) podem contribuir para explicar a presença de autoproliferação celular na SMD. Além disso, esta alteração no processo de crescimento e diferenciação celular pode ser desencadeada pelo alto índice de apoptose celular observado em nossos pacientes com SMD. Estes nossos resultados corroboram os achados divulgados por RAZA et al., (1995). Estes autores demonstraram recentemente que a apoptose celular precoce é possivelmente o fator responsável pela citopenia periférica refratária observada na maioria dos casos de SMD em face a uma medula óssea normal ou com capacidade proliferativa aumentada. Sendo assim, este aumento da morte celular poderia resultar em um estímulo aumentado para a hematopoiese. Um fator importante por nós observado, que poderia contribuir para explicar os resultados de apoptose celular, é a baixa expressão do proto-oncogene *bcl-2*, uma vez que este proto-oncogene inibe o processo de apoptose celular (KROEMER, 1997). Além disso, a alta expressão do gene supressor de tumor *p53*, verificada em estudos paralelos realizados em nosso laboratório (dados não publicados) contribui para explicar a redução da expressão do proto-oncogene *bcl-2* nas mielodisplasias. A elevada

expressão do *p-53* pode estar associada com a redução no RNA mensageiro da proteína *bcl-2*, provavelmente devido a uma região não traduzida 5' do gene *bcl-2*, a qual contém um elemento de resposta negativa, através do qual *p53* pode direta ou indiretamente diminuir a expressão do proto-oncogene *bcl-2* (MIYASHITA et al., 1994, HALDAR et al., 1994 e LEPELLEY et al., 1995). Sendo assim, *p53* estimularia a expressão do *bax*, um gene que codifica um domínio inibidor da proteína *bcl-2*. Além disso, estudos na literatura indicam que alterações nos níveis de GM-CSF, podem também contribuir para explicar parte de nossos resultados. Neste sentido, como já relatamos anteriormente, o GM-CSF parece apresentar uma ação reguladora sobre a expressão do proto-oncogene *bcl-2*, contribuindo assim para o aumento da apoptose celular e indiretamente para um aumento compensatório na hematopoiese. É importante ainda salientar, que este aumento da expansão clonal *in vitro* nas mielodisplasias, também pode proporcionar um aumento de mutações adicionais conforme sugerido nas leucemias agudas, contribuindo para a evolução desta doença para LMA, como é observado na maioria dos casos de SMD. Finalmente, a presença de autoproliferação celular nas mielodisplasias pode servir como um bom marcador no diagnóstico da SMD.

## ***VI. CONCLUSÕES***

---



O presente trabalho sobre o estudo do crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea de pacientes com LMA e SMD na ausência de estímulos exógenos (autoproliferação) e da expressão do proto-oncogene *bcl-2*, permite concluir:

1. O número de colônias de precursores hematopoiéticos apresentou-se aumentado tanto nos pacientes com LMA, assim como, nos pacientes com SMD. Na LMA, esta capacidade proliferativa aumentada está associada a um menor tempo de sobrevida dos pacientes.
2. O *bcl-2* expressa-se intensamente em células mononucleares de pacientes com LMA e sua elevada expressão interfere na resposta à quimioterapia nos pacientes refratários.
3. Os pacientes com SMD apresentam uma baixa expressão do *bcl-2* quando comparados aos indivíduos normais.
4. A percentagem de células apoptóticas apresenta-se aumentada na SMD e diminuída na LMA no décimo dia de incubação em cultura líquida.
5. O número elevado de células mononucleares com expressão do *bcl-2* correlaciona-se negativamente com a apoptose celular nos pacientes com LMA.

6. Não observa-se correlação entre a percentagem de células mononucleares com elevada expressão do *bcl-2*, capacidade autoproliferativa, idade e sub-tipo morfológico na LMA e SMD.
7. Não observa-se correlação linear entre a percentagem de células mononucleares expressando o *bcl-2* e a percentagem de apoptose celular na SMD, uma vez que as células destes pacientes apresentavam-se em elevado estágio de morte celular no décimo dia de cultura líquida.



In this work we studied the growth and differentiation of early bone marrow progenitor cells in the absence of exogenous growth factors (autonomous proliferation), the *bcl-2* expression and the number of apoptotic cells in mononuclear bone marrow cells from patients with confirmed diagnosis of Acute Myeloid Leukaemia (AML) and Myelodysplastic Syndrome (MDS). Bone marrow cells from normal individuals were used as controls. We observed an increased percentage of *bcl-2* expression on mononuclear bone marrow cells from AML patients in relation to controls ( $p = 0.002$ ). Accordingly, the number of apoptotic cells was reduced ( $p = 0.001$ ) and there was a negative correlation between *bcl-2* expression and the number of apoptotic cells ( $r = -0.664$ ,  $p < 0.001$ ) in these patients. In addition, *bcl-2* expression was significantly increased in the chemotherapy resistant group in relation to the responsive group ( $p = 0.03$ ). Survival in the group of AML patients with autonomous proliferation was reduced ( $p = 0.01$ ). These results suggest that a high *bcl-2* expression and the presence of autonomous proliferation are related with a poor prognosis in AML.

In the MDS patients, the autonomous proliferation and the percentage of apoptotic cells were also significantly greater when compared to controls ( $p = 0.001$ ). However, *bcl-2* expression was significantly lower on mononuclear bone marrow cells from MDS patients in relation to normal individuals ( $p = 0.002$  - Wilcoxon). These results suggest that the autonomous proliferation observed in these patients is counteracted by the high range of cell death which is probably related to the lower *bcl-2* expression.

## ***VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- ABRAHAMSON, G.; BOULTWOOD, J.; MADDEN, J.; KELLY, S.; OSCIER, D.G.; RACK, K.; BUCKLE, V.J. & WAINSCOT, J.S. – Clonality of cell populations in refractory anemia using combined approach of gene loss and X-linked restriction fragment length polymorphism-methylation analysis. **British Journal of Haematology**, **79**: 550-555, 1991.
- ADKINS, B.; LEUTZ, A. & GRAF, T. - Autocrine growth induced by src-related oncogenes in transformed chicken myeloid cells. **Cell**, **39**: 439-445, 1984.
- ANASTASI, J.; FENG, J.; LE BEAU, M.M; LARSON, R.A.; ROWLEY, J.D. & VARDIMAN, J.W. – Cytogenetic clonality in myelodysplastic syndromes studied with fluorescence in situ hybridization: lineage, response to growth factors therapy, and clone expansion. **Blood**, **81**: 1580-1585, 1993.
- BARRY, M.A.; BEHMKE, C.A. & EASTMAN, A. – Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. **Biochemical Pharmacology**, **40**: 2353-2362, 1990.
- BARTELMEZ, SH.; BRADLEY, TR.; BERTONCELLO, I.; MOCHIZUKI, D.Y.; TUSHINSKI R.J. STANLEY, E.R.; HAPEL, A.J.; YOUNG, I.G. KRIEGLER, A.B. & HODGSON, G.S. - Interleukin-1 plus interleukin-3 plus colony stimulating factor 1 are essential for clonal proliferation of primitive myeloid bone marrow cells. **Experimental Hematology**, **17**: 240-245, 1989.

- BAXTER, G.D.; COLLINS, R.J.; HARMON, B.V.; KUMAR, S.; PRENTICE, R.L.; SMITH, P.J. & LAVIN, M.F. – Cell death by apoptosis in acute leukaemia. **Journal of Pathology**, **158**: 123-129, 1989.
- BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.Y.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.G.; GRALNIC, H.R. & SULTAN, C. – Proposal for the classification of the myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, **51**: 189-199, 1982.
- BRADBURY, D.; ZHU, Y.M. & RUSSELL, N. - Regulation of *Bcl-2* expression and apoptosis in acute myeloblastic leukemia cells by granulocyte-macrophage colony- stimulating factor. **Leukemia**, **8**: 786-791, 1994.
- BRADBURY, D.A. & RUSSELL, N.H. - Comparative quantitative expression of *Bcl-2* by normal and leukaemic myeloid cells. **British Journal of Haematology**, **91**, 374-379, 1995.
- BRADBURY, D.A.; ZHU, Y.M. & RUSSELL, N.H. - *Bcl-2* expression in acute myeloblastic leukaemia: relationship with autonomous growth and CD34 antigen expression. **Leukemia-Lymphoma**, **24**: 221-228, 1997.
- BURSCH, W.; OBERHAMMER, F., & SCHULTE-HERMANN, R. - Cell death by apoptosis and its protective role against disease. **TIPS**, **13**: 245-251, 1992.

- CAMPOS, L.; ROUAULT, J.P.; SABIDO, O.; ORIOL, P.; ROUBI, N.; VASSELON, C.; ARCHIMBAUD, E.; MAGAUD, J. & GUYOTAT, D. - High expression of *Bcl-2* protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. **Blood** **81**: 3091-3096, 1993.
- COHEN, J. J. - Apoptosis: physiologic cell death. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, **124**: 761-765, 1994.
- COLLET, D. - Modelling survival data in medical research. Chapman & Hall Inc., 1994.
- COZZOLINO, F.; RUBARTELLI, A.; ALDINUCCI, D.; SITIA, R.; TORCIA, M.; SHAW, A.; DI-GUGLIELMO, R. - Interleukin-1 as an autocrine growth factor for acute myeloid leukemia cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **86**: 2369-2367, 1989.
- CRIFE, L.D. Adult acute leukemia. **Current Problems in Cancer**, **21**:1-64, 1997
- DELWEL, R.; BUITENEN, C.; SALEM, M.; BOT, F.; GILLIS, S.; KAUSHANSKY, K.; ALTROCK, B. & LÖWENBERG, B. - Interleukin-1 stimulates proliferation of acute myeloblastic leukemia cells by induction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor release. **Blood**, **74**: 586-593, 1989.



- DUKE, R.C. & COHEN, J.J. - IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. **Lymphokine Research**. **5**: 289-299, 1986.
- ESTROV, R.; KURZROCK, Z.; ESTEY, E.; WETZLER, M.; FERRAJOLI, A.; HARRIS, D.; BLAKE, M.; GUTTERMAN, J.U. & TALPAZ, M. - Inhibition of acute myelogenous leukemia blast proliferation by interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors. **Blood**, **79**: 1938-1945, 1992.
- FESUS, L.; DAVIES, P.J.A. & PIACENTINI, M. - Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. **European Journal of Cell Biology**, **56**: 170-177, 1991.
- GALE, R.P. & FOON, K.A. - Acute myelogenous leukemia. In: Gale, R.P. **Leukemia Therapy**. 1<sup>a</sup> ed., Boston, Blackwell, Scientific Publication, 99-145, 1986.
- GOUILLEUX-GRUART, V.; GOUILLEUX, F.; DESAINT, C.; CLAISSE, J.; CAPIOD, J.D.; WEBER-NORDT, R.; DUSANTER-FOURT, I.; DREYFUS, F.; GRONER, B. & PRIN, L. - STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. **Blood**, **87**: 1692-1697, 1996.

- HALDAR, S.; NEGRINI, M.; MONNE, M.; SABBIONI, S. & CROCE, C.M. - Down-regulation of *bcl-2* by p53 in breast cancer cells. **Cancer Research**, **54**: 2095-2097, 1994.
- HENDERSON, E.S. - Clinical course of treated and untreated adult acute leukemia. **Hematologie und Bluttransfusion** **8**: 89- 99, 1969.
- HENDERSON, E.S. - Acute leukemia: General considerations. In: Williams, W.J.; Beuther, E.; Erslev, A.J.; Lichtman, M.A. - **Hematology**, 4<sup>th</sup> ed., New York, McGraw-Hill, 236-251, 1990.
- HERSH, E.M.; WHITECAR, J.P., MCCREDIE, K.B.; BADEY, G.P. & FREIREICH, E.J. - Chemotherapy, immunocompetence, immunosuppression and prognosis in acute leukemia. **The New England Journal of Medicine**, **285**: 1211-1216, 1971.
- HOCKENBERRY, D.M.; ZUTTER, M.; HICKLEY, W.; NAHM, M. & KORSMEYER, S.J. - *Bcl-2* protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **88**: 6961-6965, 1991.
- HOEFSLOOT, L.H.; VAN AMELSVOORT, M.P.; BROEDERS, L.C.A.M.; VAN DER PLAS, D.C.; VAN LOM, K.; HOOGERBRUGGE, H.; TOUW, I.P. & LÖWENBERG B. - Erythropoietin-induced activation of *stat5* is impaired in the myelodysplastic syndrome. **Blood**, **89**: 1690-1700, 1997.

- HUNTER, A.E.; ROGERS, S.Y.; ROBERTS, I.A.G.; BARRETT, A.J. & RUSSELL, N. - Autonomous growth of blast cells is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukemia. **Blood**, **82**: 899-903, 1993.
- IKEDA, H.; KANAKURA, Y.; TAKUMA, F.; KITAYAMA, H.; SUGAHARA, H.; NISHURA, T.; KARASUNO, T.; TOMYAMA, Y.; YAMATODANI, A.; KANAYAMA, Y. & MATSUZAWA, Y. - Changes in phenotype and proliferative potential of human acute myeloblastic leukemia cells in culture with stem cell factor. **Experimental Hematology**, **21**: 1686-1694, 1993.
- JACOBS, A.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; CARO, J.; BOWEN, D.T. & LEWIS, T. - Circulating erythropoietin in patients with myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, **73**, 36-39, 1989.
- JOWITT, S.N.; LIU-YIN, J.A. & SAUNDERS, M.J. - Relapsed myelodysplastic clone differs from acute onset clone as show by X-linked DNA polymorphism patterns in a patient with acute myeloid leukemia. **Blood**, **82**: 337-342, 1993.
- KAPLAN, E.L. & MEIER, P. - Non-parametric estimation from incomplete observation. **Journal of the American State Association**, **53**: 457-466, 1958.

- KEATING, M.J.; McCREDIE, K.B.; BODEY, G.P.; SMITH, T.L.; GEHAN, E. & FREIREICH, E.J. - Improved prospects for long-term survival in adults with acute myelogenous leukemia. **JAMA** **248**: 2481-2486, 1982.
- KIKUKAWA, M.; AOKI, N. & MORI, M. - A case of refractory anaemia with p53 point mutation at codon 249 (AGG to ATG). **British Journal of Haematology**, **92**: 831-833, 1996.
- KOEFLER, H.P. - Introduction: Myelodysplastic syndromes. **Seminars in Hematology**, **33**: 87-94, 1996.
- KOSHIDA, Y.; SAEGUSA, M. & OKAYASU, I. - Apoptosis, cell proliferation and expression of *bcl-2* and *bax* in gastric carcinomas: immunohistochemical and clinicopathological study. **British Journal of Cancer**, **75**: 367-373, 1997.
- KORSMEYER, S. - *Bcl-2* initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. **Blood** **80**: 879-886, 1992.
- KOUIDES, P.A. & BENNETT, J.M. - Morphology and classification of the myelodysplastic syndromes and their pathologic variants. **Seminars in Hematology** **33**: 95-110, 1996.

- KROEMER G. The proto-oncogene *Bcl-2* and its role in regulating apoptosis. **The New England Journal of Medicine**, 6: 614-619, 1997.
- LANG, R.A. & BURGUESS, A.W. - Autocrine growth factors and tumourigenic transformation. **Immunology Today**, 11: 244-249, 1990.
- LEPELLEY, P.; SOENEN, V.; PREUDHOMME, C.; MERLAT, A.; COSSON, A. & FENAU P. - *Bcl-2* expression in myelodysplastic syndromes and its correlation with haematological features, *p53* mutations and prognosis. **Leukemia**, 9: 726-730, 1995.
- LÖWENBERG, B.; VAN PUTTEN, W. L. J.; TOUW, I. P.; DELWEL, R. & SABATINI, V. - Autonomous proliferation of leukemic cells *in vitro* as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine** 328: 614-619, 1993.
- LUTTON, J. D.; IBRAHAM, N.G.; HOFFMAN, R.; RITCHEY, A.K. & LEVERE, R.D. - Sideroblastic anemia: differences in bone marrow erythroid colony (CFU-E) growth response to erythropoietin in plasma clot and methylcellulose. **American Journal of Hematology**, 16: 216-219, 1984

- McDONNELL, T.J.; DEANE, N.; PLATT, F.M.; NUNEZ, G.; JAEGER, U.; MCKEARN, J.P. & KORSMEYER, D. - *Bcl-2* immunoglobulin transgenic mice demonstrates extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. **Cell**, **57**: 79-88, 1989.
- MANDELLI, F.; DE LIPSIS, E.; GRIGNANI, F.; MARTELLI, M.; LISO, V. & AMADORI, S. - Daunomycin, cytosine arabinoside, and 6-thioguanine (DAT) vs viscristine cytosine arabinosideo and 6 thioguanine (VAT) in the induction treatment of acute nonlymphocytic leukemia: a randomized collaborative study. **Medical and Pedriatric Oncology**, **4**: 231-240, 1978.
- MARTIN, S.J.; BRADLEY, J.G. & COTTER, T.G. - HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. **Clinical and Experimental Immunology** **79**: 448-453, 1990.
- MASON, D.Y. - Intracellular lysozyme and lactoferrin in myeloproliferative disorders. **Journal of Clinical Pathology**, **30**: 541-546, 1977.
- MAUNG, Z.T.; MACLEAN, F.R.; REID, M.M.; PEARSON, A.D.J.; PROCTOR, S.J.; HAMILTON, P.J. & HALL, A.G. - The relationship between *bcl-2* expression and response to chemotherapy in acute leukaemia. **British Journal of Haematology**, **88**: 105-109, 1994.

- MAZE, R. HORIE, M.; HENDRIE, P.; VADHAN-RAY, S.; TRICCOT, G.; GORDON, M.; NEMUNAIATIS, J.; ASHMAN, L.K. & BROXMEYER, H.E. – Differential responses of myeloid progenitor cells from patients with myeloid leukemia and myelodysplasia to the costimulating effects of steel factor *in vitro*. **Experimental Hematology**, **21**: 545-551, 1993.
- MERCHAV, S.; WAGEMAKER, G.; SOUZA, L.M. & TADARSKI, I. – Impaired response of myelodysplastic marrow progenitors to stimulation with recombinant hemopoietic growth factors. **Leukemia**, **5**: 340-346, 1991.
- METCALF, D. - Clonal culture of hemopoietic cells: techniques and applications. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1984.
- METZ, T.; GRAF, T. & LEUTZ, A. - Activation of cMGF expression is critical step in avian myeloid leukemogenesis. **EMBO Journal**, **10**: 837-844, 1991.
- MIYASHITA, T.; HARIGAI, M.; HANADA, M. & REED, J.C. - Identification of a p53-dependent negative response element in the *Bcl-2* gene. **Cancer Research**, **54**: 3131-3135, 1994.
- MOCHIZUKI, D.Y.; EISENMAN, J.R.; CONLON, P.J.; LARSEN, A.D. & TUSHINSKI R.J. - Interleukin-1 regulates hematopoietic activity, a role previously ascribed to hemopoietin 1. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **84**: 5267-5271, 1987.

- NOWAK, R. - Dying cells reveal new role for cancer genes. **The Journal of NIH Research**, 4, 48-52, 1992.
- NUÑEZ, G.; LONDON, L.; HOCKEMBERY, D.; ALEXANDER, M.; MCKEARN, J.P. & KORSMEYER, S.J. - Deregulated *Bcl-2* gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. **The Journal of Immunology**, 144: 3602-3610, 1990.
- OSTER, W.; CICCIO, N.A.; KLEIN, H.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. & LINDEMANN, A. - Participation of the cytokines interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and Interleukin 1-beta secreted by acute myelogenous leukemia blasts in autocrine and paracrine leukemia growth control. **Journal Clinical of Investigation**, 84: 451-457, 1989.
- PIACIBELLO, W.; SANAVIO, F.; BRESSO, P.; SEVERINO, A.; CARLESSO, N.; PREGNO, P.; STACCHINI, A.; MORELLI, S.; FUBINI, L.; GALLO, E.; AGLIETA, M. & FERRERO, D. - Stem cell factor improvement of proliferation maintenance of hemopoietic progenitors in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, 8: 250-257, 1994.
- PIETSCH, T.; KYAS, U.; STEFFENS, U.; YAKISAN, E.; HADAM, M.R.; LUDWIG, W.D. ZSEBO, K. & WELTE, K. - Effects of human stem cell factor (c-kit ligant) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hemopoietic growth factors. **Blood**, 80: 1199-1206, 1992.



- RAJAPAKSA, R.; GINZTON, N.; ROTT, L.S. & GREENBERG, P.L. - Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. **Blood**, **88**: 4275-4287, 1996.
- RAI, K.R.; HOLLAND, J.F.; GLIDEWEL, O.J.; WEINBERG, V.; BRUNNER, K.; OBRECHT, J.P.; PREISLER, H.D.; NAWABI, I.N.; PRAGER, D.; CAREY, R.W.; COOPER, M.R.; HAURANI, F.; HUTCHISON, J.L.; SILVER, R.T.; FALKSON, G.; WIERNICK, P.; HOAGLAND, H.C.; BLOOMFIELD, C.D.; JAME, G.W.; GOTTLIEB, A.; RAMANAN, S.V.; BLOM, J.; MISSEN, N.F.; BANK, A.; ELLISON, R.R.; KUNG, F.; HENRY, P.; McINTYRE, O.R. & KAN, S.K. - Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by the cancer and leukemia group B. **Blood**, **58**: 1203-1209, 1981.
- RAMBALDI, A.; TORCIA, M.; BETTONI, S.; VANNIER, E.; BARBUI, T.; SHAW, A.R.; DINARELLO, C.A. & COZZOLINO, F. - Modulation of cell proliferation and cytokine production in acute myeloblastic leukemia by interleukin-1 receptor antagonist and lack of its expression by leukemic cells. **Blood**, **78**: 3248-3253, 1991.
- RAZA, A.; GEZER, S.; MUNDLE, S.; GAO, X.; ALVI, S.; BOROK, R.; RIFKIN, S.; IFTIKHAR, V.S.; PARCHARIDOU, A.; LOEW, J.; MARCUS, B.; KHAN, Z.; CHANEY, C.; SHOWEL, J.; GREGORY, S. & PREISLER, H. - Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and haemopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. **Blood**, **86**: 268-276, 1995.

- RUSSELL N.H.; HUNTER A.E.; BRADBURY D.; ZHU, Y.M. & KEITH, F. - Biological features of leukaemic cells associated with autonomous growth and reduced survival in acute myeloblastic leukaemia. **Leukemia-Lymphoma**, 16: 223-229, 1995.
- SAVILL, J.; DRESNFIELD, I.; HOGG, N. & ANDHASLETT, C. - Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Nature**, 343: 170-173, 1990.
- SCHIPPERIUS, M.; SONNEVELD, P.; LINDEMANS, J.; HAGEMEIJER, A.; VINK, N.; PEGELS, J. & ABELS, J. - The effects of interleukin-3, GM-CSF, and G-CSF on the growth kinetics of colony-forming cells in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, 4: 267-272, 1990.
- SCHWARTZMAN, R.A. & CIDLOWSKI, J. - Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. **Endocrine Review**, 14: 133-151, 1993.
- SHERR, C. - Colony-stimulating factor-1 receptor. **Blood**, 75: 1-15, 1990.
- SHETTY, V.; MUNDLE, S.; ALVI, S.; SHOWEL, M.; BROADY-ROBINSON, L.; DAR, S.; BOROK, R.; SHOWEL, J.; GREGORY, S.; RIFKIN, S.; GEZER, S.; PARCHARIDOU, A.; VENUGOPAL, P.; SHAH, R.; HERNANDEZ, B.; KLEIN, M.; ALSTON, D.; ROBIN, E.; DOMINQUEZ, C. & RAZA, A. - Measurement of apoptosis, proliferation and three cytokines in 46 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research**, 20: 891-900, 1996.

- SILVA, E.S.; LORAND-METZE, I.; BINCOLETTA, C. & SAAD, S.T.O. - Patterns of expression of Ras, P53 and MDM2 proteins in myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research**, 21 (suppl.1) 143a, 537, 1997.
- SOLIGO, D.; SERVIDA, F.; CORTELEZZI, A.; PEDRETTI, D.; UZIEL, L.; MORGUTTI, M.; POGLIANI, E. & LAMBERTENGHI DELILIERI, G. - Effects of recombinant human stem cell factor (rh-SCF) on colony formation and long-term bone marrow cultures (LTBMC) in patients with myelodysplastic syndromes. **European Journal of Haematology**, 52: 53-60, 1994.
- SOLIGO, D.A.; CAMPIGLIO, S.; SERVIDA, F.; BOSSOLASCO, P.; ROMITTI, L.; CORTELEZZI, A. & LAMBERTENGHI-DELILIERI, G. - Response of myelodysplastic syndrome marrow progenitor cells to stimulation with cytokine combinations in a stroma-free long-term culture system. **British Journal of Haematology**, 92: 548-558, 1996.
- TSUJIMOTO, Y.; FINGER, L.R.; YUNIS, J.; NOWELL, P.C. & CROCE, C. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14,18) chromosome translocation. **Science**, 226: 1097-1097, 1984.
- TIVEY, H. - The natural history of untreated acute leukemia. **Annual New York Academy of Science**, 60: 322-327, 1955.

- TOSATO, G. & JONES, K.D. - Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. **Blood**, **75**: 1305- 1310, 1990.
- VAUX, D.L.; CORY, S. & ADAMS, J.M. - *Bcl-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature**, **335**: 440-442, 1988.
- VAUX D.L. - Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiologic cell death. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **90**: 786-789, 1993.
- WIERNIK, P.H.; GLIDEWELL, O.J.; HOAGLAND, H.C.; BRUNNER, K.W.; SPURR, C.L. CUTTNER, J.; SILVER, R.T. CAREY, R.W.; DELDUCA, V.; KUNG, F.H. & HOLLAND, J.F. - A comparative trial of daunorubicin, cytosine arabinoside, and thioguanine, and a combination of the three agents for the treatment of acute myelocytic leukemia. **Medicine and Pediatric Oncology**, **6**: 261-277, 1979.
- WILLIAMS, G.T.; SMITH, C.A.; SPOONCER, E.; DEXTER, T.M.; & TAYLOR, D.R. - Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. **Nature** **343**: 76-79, 1990.

WILLIAMS, G.T. – Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. **Cell**, **65**: 1097-1098, 1991.

WINTROBE, M.M. – Acute myeloid leukemias. In: Wintrobe, M.M. **Clinical Hematology**, 8<sup>th</sup> ed, Philadelphia, Lea Febiger, 1536-1557, 1981.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R. & CURRIE, A.R. – Cell death: the significance of apoptosis. In: **International Review of Cytology**, **68**: 251-306, 1980.

YATES, J.W.; WALLACE, H.J.; ELLISON, R.R. & HOLLAND, J.F. – Cytosine arabinoside (NSC 63878) and daunorubicin (NSC 83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. **Cancer Chemotherapy Response**, **57**: 485-488, 1973.

YOUNG, D.C. & GRIFFIN, J.D. -Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic leukemia. **Blood**, **68**: 1178-1181, 1986.

YOUNG, D.C.; WAGNER, K. & GRIFFIN, J.D. - Constitutive expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene in acute myeloblastic leukemia. **Journal of Clinical Investigation**, **79**, 100-106, 1987.

\* HERANI, M.L.G. – Normas para apresentação de dissertações de teses. BIREME, São Paulo, 1991, 45p.



**Tabela 1** - Número de colônias obtidas através da avaliação do crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos (CFU-C) da medula óssea de pacientes com LMA, na ausência de estímulos exógenos (n = 28).

PACIENTES	COLÔNIAS
W.P.	3115
A.D.	237
V.S.S.	1
M.E.S.	120
B.A.C.	720
P.S.S.	0
M.G.N.	32
P.C.B.	540
A.F.C.	411
A.A.M.	308
P.F.A.	480
S.A.L.O.	1044
H.P.A.	0
S.R.P.	0
R.L.O.	14
G.M.S.	11
F.P.A.	0
G.S.	310
L.P.S.	70
M.H.P.	0
A.M.S.	0
P.P.M.	456
E.B.J.	305
L.C.M.V.	1
L.M.C.	80
D.P.L.	16
R.C.S.	15
S.V.S.	0

**Tabela 2** - Número de colônias obtidas através da avaliação do crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos (CFU-C) da medula óssea de pacientes com SMD, na ausência de estímulos exógenos (n = 12).

PACIENTES	COLÔNIAS	CLASSIFICAÇÃO
O.F.	100	AREBt
O.F.S.	52	AR
B.M.D.	57	AR
H.F.S.	80	AR
B.F.D.	146	ARSA
Y.X.S.	9	AR
J.M.J.	558	AR
W.B.	540	AR
L.C.C.	62	AR
A.M.S.	0	AR
E.F.S.	300	AR
D.G.B.	70	AR



*Tabela 3* - Número de colônias obtidas através da avaliação do crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos (CFU-C) da medula óssea de indivíduos normais, na ausência de estímulos.

<b>DOADORES</b>	<b>COLÔNIAS</b>
1	0
2	0
3	0
4	0
5	11
6	0
7	0
8	0
9	0
10	12
11	6
12	0
13	15
14	9
15	0
16	0
17	10
18	0
19	16

**Tabela 4** - Percentagem de células apoptóticas em indivíduos normais, obtida antes de iniciarmos os ensaios de cultura líquida e a partir do oitavo, décimo e décimo-quarto dias.

DOADORES	% DE CÉLULAS APOPTÓTICAS			
	antes dos ensaios de cultura	8 <sup>o</sup> dia	10 <sup>o</sup> dia	14 <sup>o</sup> dia
1	0	24,0	50,5	79,5
2	0	26,7	46,4	69,4
3	0	28,5	44,3	67,8
4	0	20,2	47,3	70,3
5	0	17,5	30,8	67,2
6	0	28,5	42,2	82,4
7	0	31,2	40,1	89,9
média	0	25,2	43,1	75,2
desvio padrão	0	4,57	5,9	8,1

**Tabela 5** - Percentagem de células apoptóticas de indivíduos com leucemia mieloide aguda (LMA), obtida no décimo dia de cultura líquida ( n = 18).

PACIENTES	APOPTOSE %
G.M.S.	13,9
F.P.A.	7,0
A.A.M.	3,9
P.C.B.	9,1
A.F.C.	7,1
M.G.N.	8,3
V.S.S.	6,6
A.D.	17,4
P.S.S.	5,5
L.C.M.V.	10,3
P.F.A.	43,5
S.A.L.O.	47,7
P.P.M.	9,1
L.P.S.	9,4
M.E.S.	45,7
L.C.M.	3,2
E.B.J.	11,0
E.G.S.	18,2

**Tabela 6** - Percentagem de células apoptóticas em indivíduos com Síndrome Mielodisplásica (SMD), obtida no décimo dia de cultura líquida (n = 11)

PACIENTES	APOPTOSE (%)
O.F.	91,3
O.F.S.	84,0
E.E.	89,0
H.F.S.	89,4
B.M.V.	85,1
Y.X.S.	92,6
J.M.J.	96,0
W.B.	92,5
A.M.S.	64,2
H.S.	90,2
L.C.C.	82,8

**Tabela 7** - Percentagem de células apoptóticas de indivíduos doadores de medula óssea para transplante do Hospital das Clínicas da UNICAMP, obtida no décimo dia de cultura líquida (n = 11).

DOADORES	APOPTOSE (%)
1	50,5
2	46,4
3	44,3
4	47,3
5	30,8
6	42,2
7	40,1
8	47,8
9	61,3
10	53,9
11	59,7

**Tabela 8** - Percentagem de expressão do proto-oncogene *bcl-2* em células mononucleares de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) (n = 28).

PACIENTES	EXPRESSÃO DO PROTO-ONCOGENE <i>BCL-2</i> (%)
W.P.	63,0
S.V.S.	78,3
B.A.C.	66,0
F.P.A.	71,4
D.P.L.	82,6
A.A.M.	82,2
A.F.C.	78,8
A.A.A.A.	71,6
P.F.A.	18,2
V.S.S.	80,9
G.M.S.	40,6
R.L.O.	48,3
A.M.S.	61,2
L.P.S.	72,2
P.S.S.	76,8
L.C.M.V.	98,0
M.G.N	74,0
M.H.P.	20,5
M.E.S.	53,0
A.D	47,9
E.G.S.	68,2
S.A.L.O.	31,7
L.M.C.	66,3
G.S.	33,8
P.P.M.	60,2
E.B.J.	43,0
H.P.A.	96,0
P.C.B	66,0

**Tabela 9** - Percentagem de expressão do proto-oncogene *bcl-2* em células mononucleares de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) (n = 15).

<b>PACIENTES</b>	<b>EXPRESSÃO DO PROTO-ONCOGENE <i>BCL-2</i> (%)</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO</b>
O.F.	26,7	AREBt
L.C.C.	22,2	AR
H.S.	26,0	AR
B.F.D.	18,2	ARSA
J.M.J.	27,0	AR
Y.X.S.	19,2	AR
W.B.	12,0	AR
B.M.V.	18,5	AR
O.F.S.	22,2	AR
J.G.	27,4	AR
C.L.T.	26,0	AR
D.G.B.	39,4	AR
B.X.	22,0	AR
E.F.S.	14,0	AR
F.R.	32,0	AR

**Tabela 10** - Percentagem de expressão do proto-oncogene *bcl-2* em células mononucleares de doadores de medula óssea para transplante do Hospital das Clínicas da UNICAMP (n = 15)

DOADORES	EXPRESSÃO DO PROTO-ONCOGENE <i>BCL-2</i> (%)
1	51,0
2	43,5
3	30,0
4	15,0
5	39,3
6	36,6
7	32,8
8	27,0
9	38,7
10	49,6
11	22,0
12	42,7
13	43,9
14	28,0
15	20,0



**Tabela 11** - Resultados utilizados na análise de correlação entre a percentagem de apoptose celular e a expressão do proto-oncogene *bcl-2* em células mononucleares de pacientes com leucemia mileóide aguda (LMA) (n = 18).

<b>PACIENTE</b>	<b>EXPRESSÃO <i>BCL-2</i> (%)</b>	<b>APOPTOSE CELULAR (%)</b>
F.P.A.	71,4	7,06
A.A.M.	82,2	3,9
A.F.C.	78,8	7,1
G.M.S.	40,6	13,9
A.D.	47,9	17,4
L.P.S.	72,2	9,4
L.C.M.V.	98,0	10,3
P.S.S.	76,8	5,5
V.S.S.	80,9	6,6
M.G.N.	74,0	8,3
E.G.S.	68,2	18,2
E.B.J.	43,0	11,0
P.P.M.	60,2	9,1
L.M.C.	66,3	3,2
P.C.B.	66,0	9,1
S.A.L.O.	31,7	47,7
M.E.S.	53,0	45,7
P.F.A.	18,2	43,5

**Tabela 12** – Percentagem de células mononucleares com expressão do proto-oncogene *bcl-2* em pacientes responsivos e refratários à quimioterapia

*Bcl-2* (percentagem de expressão)

<i>Pacientes refratários</i>	<i>Pacientes responsivos</i>
66,0	48,3
66,0	82,6
96,0	40,6
71,5	31,7
71,6	66,3
98,0	21,0

p = 0.03, Wilcoxon