

ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA EM CULTURA BI E TRIDIMENSIONAL DE ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA

Leandro Dutra Borges de Almeida

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em clínica médica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Orientadores: Prof^a. Maria Isabel Doria Rossi
Prof. Nelson Spector

Rio de Janeiro
Dezembro/2007

**ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÔNICA EM CULTURA BI E TRIDIMENSIONAL DE ESTROMA DE MEDULA
ÓSSEA**

Leandro Dutra Borges de Almeida

Orientadores:

Prof^a. Maria Isabel Doria Rossi

Prof. Nelson Spector

Dissertação submetida ao Corpo Docente de curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Clínica Médica.

Aprovada em _____ de _____ de _____

Banca Examinadora:

Prof. José Carlos Oliveira de Moraes (Presidente)

Prof. Hélio dos Santos Dutra

Prof. Henrique Couto Teixeira

Rio de Janeiro
Dezembro/2007

Almeida, Leandro Dutra Borges de

Análise da migração de linfócitos da leucemia linfocítica crônica em cultura bi e tridimensional de estroma de medula óssea / Leandro Dutra Borges de Almeida – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2007.

xiii, 90 f. : il. ; 31 cm

Orientadores: Maria Isabel Doria Rossi e Nelson Spector

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Clínica Médica, 2007.

Referências bibliográficas: f. 59-76

1. Leucemia crônica de células B - fisiopatologia. 2. Células da medula óssea. 3. Técnicas de cultura de células. 4. Movimento celular. 5. Citometria de fluxo - métodos. 6. Clínica Médica - Tese. I. Rossi, Maria Isabel Doria. II. Spector, Nelson. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Clínica Médica. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida e saúde;

Aos meus Pais, pelos os exemplos;

À Priscila, Antônio e Thomás, os motivos das minhas lutas e das minhas buscas para melhorar;

Ao Prof. Nelson Spector pela oportunidade de aprender e de conviver com um ícone da comunidade científica brasileira;

À Prof^a. Maria Isabel pelos sacrifícios, pela paciência, pela dedicação e pelos ensinamentos;

À Leandra, Ana Paula e Dani, alunas do laboratório que foram mestras.

SUMÁRIO

agradecimentos	iv
sumário.....	v
listas	vii
1) Tabelas	vii
2) Figuras.....	viii
3) Siglas	ix
resumo.....	x
abstract.....	xii
1) INTRODUÇÃO	1
1.1) Definição.....	1
1.2) Histórico	3
1.3) Epidemiologia	4
1.4) Etiologia da LLC.....	6
1.5) LLC Familiar	7
1.6) Quadro Clínico	7
1.7) Fatores Prognóstico.....	8
1.8) Classificação.....	11
1.9) Biologia da LLC.....	18
2) OBJETIVOS.....	30
2.1) Geral	30
2.2) Específicos	30
3) Material e método	31
3.1) Pacientes	31
3.2) Amostras.....	31
3.3) Separação e preparação das células mononucleadas	31
3.4) Citometria de fluxo	32
3.5) Cultura de estroma de medula óssea	32
3.6) Co-cultura de estroma de medula óssea e células leucêmicas	33
3.7) Análise Estatística.....	35
4) RESULTADOS.....	36

4.1) Característica dos Pacientes	36
4.2) Avaliação da sobrevivência dos linfócitos leucêmicos <i>in vitro</i>	38
4.3) Cinética de migração de células leucêmicas ao longo do tempo em cultura bidimensional de células de estroma de medula óssea	40
4.4) Cinética de migração de células leucêmicas ao longo do tempo em sistema tridimensional (esferóide) de cultura de estroma de medula óssea..	46
4.5) Migração de células leucêmicas em sistema bidimensional (monocamada) de cultura de células de medula óssea conforme diferentes concentrações aplicadas.....	50
4.6) Migração de células leucêmicas em sistema tridimensional (esferóide) de cultura de células de medula óssea conforme diferentes concentrações aplicadas.....	51
5) DISCUSSÃO	53
6) CONCLUSÃO	57
7) BIBLIOGRAFIA	59
8) ANEXOS	77
1) Ficha dos Pacientes.....	77
2) Termo de Consentimento	78
3) Exemplo do Experimento de Migração	80
4) Pôster apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia de 2005.....	83
5) Análise Estatística (SPSS 13.0).....	84

LISTAS

1) Tabelas

Tabela 1. Taxa de incidência da LLC nos EUA conforme sexo e etnia. (Fonte: SEER, 2007)	5
Tabela 2. Sistemas de estagiamento clínico da LLC.	10
Tabela 3. Correlação entre os estagiamentos de Rai e Binet e estratificação do risco conforme a sobrevida.	10
Tabela 4. Características dos casos do estudo.....	37
Tabela 5. Cinética de migração das amostras de LLC em monocamada de estroma de medula óssea humana conforme diferentes intervalos de tempo.....	42
Tabela 6. Distribuição dos casos conforme algumas variáveis e o percentual migrado em monocamada.....	44
Tabela 7. Correlação entre o potencial de migração na monocamada de estroma de medula óssea e idade média dos pacientes.....	45
Tabela 8. Cinética de migração das amostras de LLC em esferóides de estroma de medula óssea humana conforme diferentes intervalos de tempo.....	48
Tabela 9. Valores da migração em monocamada conforme diferentes concentrações celulares.	50
Tabela 10. Valores da migração em esferóide conforme diferentes concentrações celulares	52

2) Figuras

Figura 1. Ilustração comparativa da morfologia celular nos sistemas de cultura bidimensional e tridimensional.....	26
Figura 2. Caracterização fenotípica das células leucêmicas no sangue periférico..	38
Figura 3. Gráfico da viabilidade das células leucêmicas em cultura ao longo do tempo.	39
Figura 4. Fotomicrografia da co-cultura de células leucêmicas com células de estroma de medula óssea humana	40
Figura 5. Citometria de fluxo das células leucêmicas marcadas com CFSE e de células de estroma de medula óssea em co-cultura.....	41
Figura 6. Gráficos das migrações das células leucêmicas em monocamada de células de estroma de medula óssea em relação ao tempo.....	43
Figura 7. Correlação entre a capacidade de migrar em monocamada de células de estroma de medula óssea e a idade dos pacientes.....	45
Figura 8. Morfologia dos esferóides de células de estroma de medula óssea humana.....	47
Figura 9. Gráfico das migrações das células leucêmicas em esferóide de células de estroma de medula óssea em relação ao tempo.....	49
Figura 10. Aspecto morfológico de esferóide de células de estroma de medula óssea humana co-cultivado com células de LLC-B.	49
Figura 11. Gráfico da migração de células leucêmicas em monocamada de células de estroma de medula óssea em relação à concentração celular.....	51
Figura 12. Gráfico da migração de células leucêmicas em esferóides de células de estroma de medula óssea em relação à concentração celular.....	52

3) Siglas

BCL-2, proteína 2 de leucemia/linfoma de células B

CD, cluster de diferenciação

CFSE, 5-(e 6-)-carboxifluoresceína diacetato succinil éster

CXCL, quimiocina da família CXC

CXCR, receptor de quimiocinas da família CXC

DLPC, Doenças Linfoproliferativas Crônicas

HUCFF, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

Ig, Imunoglobulina

IgVH, porção variável da cadeia pesada da imunoglobulina

LBM, Linfocitose B Monoclonal

NLCs, células *Nurse-like*

PBS, solução salina tamponada com fosfato

SDF-1, fator 1 derivado de estroma

SEER, *Surveillance Epidemiology and End Results*

sIg, Imunoglobulina de superfície

VCAM-1, Molécula 1 de adesão às células endoteliais

VLA-4, *Very Late Antigen 4*

ZAP-70, *Zeta Associated Protein 70Kd*

RESUMO

ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA EM CULTURA BI E TRIDIMENSIONAL DE ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA

Leandro Dutra Borges de Almeida

Orientadores:

Prof^a. Maria Isabel Doria Rossi

Prof. Nelson Spector

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma neoplasia de linfócitos B CD5⁺ circulantes, com diferentes padrões de infiltração da medula óssea e diversos graus de acometimento dos gânglios linfáticos, fígado e baço. Atualmente, acredita-se que esta leucemia apresenta uma biologia dinâmica, com proliferação e morte celular em taxas variáveis, que dependem dos estímulos recebidos dos diversos microambientes, principalmente medular, e da capacidade de resposta do clone leucêmico a estes estímulos. Uma vez que o microambiente da medula óssea parece ter papel fundamental na proliferação e inibição da apoptose das células leucêmicas, é possível que a leucemia seja mantida somente por uma subpopulação de linfócitos leucêmicos, capazes de interagir com as células do estroma medular e migrar por entre estas através de uma rede tridimensional formada pelos seus prolongamentos. O objetivo deste estudo foi avaliar a interação dos linfócitos leucêmicos com células do estroma de medula óssea humano em sistemas de cultura bi e tridimensional. Linfócitos leucêmicos do sangue periférico de pacientes com LLC-B, recém diagnosticada ou não tratada, foram marcados com CFSE e co-cultivados com células de estroma de medula óssea humana normal organizadas

em monocamadas ou em cultura 3-D do tipo esferóide. O percentual de migração foi determinado e os resultados comparados com variáveis clínicas e biológicas. Nossos resultados sugerem que apenas uma subpopulação de linfócitos leucêmicos, cujo percentual variou de paciente para paciente, foi capaz de migrar para o estroma e que esta subpopulação foi significativamente menor nos esferóides (1,1% a 49,1% em monocamada e 0,7% a 3,1% em esferóide). Além disto, o percentual de células leucêmicas na monocamada de estroma variou com o número de células aplicadas, enquanto que o percentual de células no esferóide não se alterou. Este resultado sugere que o modelo de cultura 3-D é capaz de discriminar subpopulações com maior capacidade de migração, que são potencialmente responsáveis pela manutenção do clone leucêmico. Finalmente, a análise dos dados sugere que os linfócitos dos casos aparentemente mais agressivos tendem a migrar mais.

Palavras-chave: 1. Leucemia crônica de células B. 2. Células da medula óssea. 3. Técnicas de cultura de células. 4. Movimento celular. 5. Citometria de fluxo.

ABSTRACT**ANALYSIS OF MIGRATION OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA CELLS IN A TWO AND THREE DIMENSION BONE MARROW STROMA CELL CULTURE**

Leandro Dutra Borges de Almeida

Orientadores:

Prof^a. Maria Isabel Doria Rossi

Prof. Nelson Spector

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a malignancy of circulating CD5⁺ B lymphocytes, with different patterns of the bone marrow infiltration and diverse degrees of involvement of lymph nodes, liver and spleen. Currently, it is believed that this leukemia presents a dynamic biology, with a variable index of proliferation and cell death that depend upon the stimuli received from different microenvironments, mainly the bone marrow, and the capacity of the leukemic clone to respond to them. Since the bone marrow microenvironment seems to have a major role in controlling the proliferation of leukemic cells, as well as in protecting them from apoptosis, it is possible that the leukemia is maintained by a subpopulation of leukemic cells that are able to interact with bone marrow stromal cells and migrate through a three-dimensional net formed by their cytoplasm prolongations. The objective of this study was to evaluate the interaction of B-CLL cells with human bone marrow stromal cells in a two and three dimension culture system. Leukemic cells were isolated from the peripheral blood of patients with a recent diagnostic of B-CLL or that were not treated. Cells were incubated with CFSE and co-cultured with normal human bone marrow stromal cells that were organized as monolayers or as a 3-D culture system called spheroid. The percentage of migration was determined and the results

compared with clinical and biological variables. Our results suggests that only a subpopulation of leukemic cells, whose percentage varied from patient to patient, was able to migrate among the stromal cells and this subpopulation was significantly smaller in spheroids (1,1% a 49,1% in monolayer and 0,7% a 3,1% in spheroids). Moreover, the percentage of leukemic cells among the stromal layers varied with the number of plated cells, while the percentage of cells inside the spheroids did not change. These results suggest that the 3-D culture model is able to discriminate subpopulations with higher migratory capacity, which are potentially responsible for the maintenance of the leukemic clones. Finally, data analysis suggests that cells from the putative more aggressive cases tend to migrate more.

Key-words: 1. Leukemia, B-Cell, Chronic. 2. Bone marrow cells. 3. Cell culture techniques. 4. Cell movement. 5. Flow cytometry.

1) INTRODUÇÃO

1.1) Definição

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma neoplasia hematopoética caracterizada pelo aumento de pequenos linfócitos monoclonais na medula óssea, sangue periférico e tecidos linfóides (KEATING, 2002) que também pode se apresentar apenas como tumor nodal sem linfocitose no sangue periférico sendo denominado Linfoma Linfocítico (HARRIS et al., 1999). De acordo com *National Cancer Institute Working Group on Chronic Lymphocytic Leukemia*, o diagnóstico clínico requer uma contagem acima de 5×10^3 linfócitos maduros por microlitro de sangue periférico e mais de 30% de linfócitos na medula óssea que persiste por mais de um mês (CHESON et al., 1996), independente da presença de linfonodomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia ou plaquetopenia.

Até recentemente acreditava-se que a LLC poderia ter origem tanto da linhagem B quanto T, contudo avanços no estudo do fenótipo e das alterações moleculares melhoraram nosso conhecimento sobre o sistema imune e sobre as neoplasias linfóides e permitiram uma melhor caracterização destas patologias. Diversas síndromes linfoproliferativas T foram identificadas e hoje são consideradas entidades clinico-patológicas distintas que fazem parte do diagnóstico diferencial da LLC. O termo LLC designa uma síndrome linfoproliferativa específica do linfócito B (HAMBLIN, 2000)

Os linfócitos leucêmicos expressam antígenos específicos da linhagem B (CD19, CD20 e CD23), mas diferem dos linfócitos B normais pela expressão de CD5, associada à fraca expressão de CD79b, CD20, CD22 e pela monoclonalidade na cadeia leve de imunoglobulina (kappa ou lambda). Este perfil fenotípico permite um diagnóstico preciso de LLC e auxilia na distinção com outras síndromes que cursam com linfocitose e que compõem, junto com a LLC, as chamadas doenças linfoproliferativas crônicas (DLPC), tais como leucemia prolinfocítica, tricoleucemia, linfoma de células do manto e outros linfomas leucemizados que mimetizam a LLC (DIGHIERO, 2005).

Alguns indivíduos apresentam linfocitose monoclonal persistente, com fenótipo da LLC, mas que não preenchem os critérios diagnósticos para LLC. Estes casos são denominados de linfocitose B monoclonal (LBM) CD5+ e acometem cerca de 3,5% da população acima dos 40 anos, com prevalência progressivamente maior quanto maior a idade da população estudada (RAWSTRON et al., 2002a). Nos familiares de pacientes com LLC, a LBM foi descrita em 13,5% dos indivíduos adultos. Na LBM são detectados alguns padrões moleculares semelhante aos encontrados na LLC e homogeneidade clonal em relação ao gene IgVH na maioria dos casos, com risco de progressão para diversos tipos de DLPC, principalmente para LLC, mas não existem evidências de que estas células representem um clone maligno (RAWSTRON et al., 2002b).

Caso a LBM seja uma alteração precursora a LLC, um número significativo de casos deve regredir ou manter-se estável uma vez que a prevalência da LBM é maior que a prevalência da LLC. Uma revisão traz os dados de um acompanhamento de cinco anos que demonstram que 60% dos casos possuem linfocitose estável ou regressiva, 35% apresentam aumento no número de linfócitos e 5% necessitarão de tratamento (MARTI et al., 2005).

Existe ainda um subgrupo de pacientes com LLC que apresentam doença estável, não progressiva, com sobrevida semelhante à de uma população controle aos quais têm sido atribuídos os termos linfocitose B monoclonal benigna, LLC indolente, linfocitose crônica idiopática persistente ou linfocitose monoclonal B de significado indeterminado (FALCÃO, 2005). Por isso o *International Workshop on CLL* recomenda como critério diagnóstico o valor de 10×10^3 linfócitos maduros por microlitro de sangue periférico e >40% de linfócitos na medula óssea, estes valores provavelmente minimizam a inclusão dos casos de linfocitose B monoclonal benigna no diagnóstico de LLC (CHESON et al., 1996).

Estes dados contribuem para o conceito de que a LLC é uma neoplasia com um amplo espectro de carga tumoral, mas o risco para progressão é independente da massa tumoral no momento da apresentação. Um exemplo disto é a avaliação clínica dos pacientes com LLC que ainda hoje conta com sistemas de estadiamento que refletem o padrão de disseminação da doença e a massa tumoral, mas falham em identificar o subgrupo com risco de progressão. Os benefícios da identificação precoce dos casos de linfocitose ainda não estão estabelecidos, mas certamente servirá para identificar os mecanismos para progressão da doença.

1.2) Histórico

O momento preciso do reconhecimento da LLC, bem como de todos os outros tipos de leucemia, é impreciso, mas todos reportam a um mesmo período histórico. Em 1845, quase simultaneamente, Bennett e Virchow descreveram um grupo de doenças chamadas por Virchow de leucemias. O próprio Virchow relatou dentre elas duas formas mais insidiosas, numa das quais os pacientes apresentavam esplenomegalia, hepatomegalia, linfonodomegalias e aumento de pequenas células agranulares no sangue que provavelmente correspondiam a LLC (KIPPS, 2001; RAI & WASIL, 2001).

Em 1903, após a classificação das leucemias em formas agudas e crônicas por Friedreich (1857) e após a descoberta por Ehrlich (1891) das colorações histoquímicas que permitiram a classificação das leucemias em mielóide ou linfóide, Turk descreveu pela primeira vez a LLC como entidade clínica distinta, propôs o termo linfomatose para agrupar as desordens linfoproliferativas e, devido a sua natureza indolente, classificou a LLC como uma linfomatose benigna (KIPPS, 2001).

Em 1924, Minot e Isaacs descreveram a história natural de 98 casos e mudaram a noção da LLC como processo benigno. Apesar dos inúmeros estudos nos anos subsequentes, apenas em 1966 Galton e Dameshek sugeriram que a principal característica fisiopatológica da LLC fosse o acúmulo progressivo de linfócitos imortalizados e funcionalmente incompetentes (KIPPS, 2001; RAI & PATEL, 2000).

Até poucos anos atrás se acreditava nesta teoria de que a LLC era uma doença caracterizada exclusivamente pelo acúmulo de células devido aos defeitos na apoptose. Porém, algumas observações recentes sobre as células leucêmicas colocaram este conceito em cheque, as células leucêmicas apresentam telômeros mais curtos que os linfócitos B normais, sugerindo que o clone leucêmico tenha sofrido um número considerável de divisões (DAMLE et al., 2004). Um estudo utilizando uma técnica para marcar *in vivo* as moléculas de DNA recém sintetizadas nas células em divisão demonstrou que a LLC não é uma doença estática que resulta simplesmente do acúmulo de linfócitos imortalizados, mas sim uma doença dinâmica na qual as células proliferam e morrem em níveis apreciáveis. Esta capacidade proliferativa pode compensar a perda clonal que ocorre na periferia e é responsável por determinar a taxa de crescimento tumoral (MESSMER et al., 2005).

1.3) Epidemiologia

Apesar da fácil suspeita clínica diante de uma linfocitose, como o acesso da população de baixa renda aos exames complementares de rotina é difícil e muitos casos são assintomáticos, sem requerer tratamento ou internações e como o diagnóstico de certeza necessita da citometria de fluxo que apenas é encontrada em grandes centros, os estudos epidemiológicos da LLC na população brasileira são difíceis de serem realizados e acredita-se que os dados relatados na literatura são subestimados. Informações sobre a epidemiologia da LLC no Brasil, envolvendo razoável casuística, não foram encontrados na literatura (YAMAMOTO & FIGUEIREDO, 2005).

Nos EUA, a incidência da LLC, ajustada para as idades, entre os anos de 2000 e 2004 foi 3,9 casos novos para cada 100.000 indivíduos e a taxa de mortalidade foi de 1,5 indivíduos para cada 100.000. Para este mesmo período a mediana da idade ao diagnóstico foi 72 anos, com nenhum caso ocorrendo na faixa etária abaixo dos 20 anos; 0,3% entre 20 e 34 anos; 1,9% entre 35 e 44 anos; 8,9% entre 45 e 54 anos; 19% entre 55 e 64 anos; 27% entre 65 e 74anos; 30% entre 75 e 84 anos; e 12,8% na faixa etária acima dos 85 anos. A mediana da idade no óbito foi 78 anos (SEER, *Surveillance Epidemiology and End Results*, 2007). Esta distribuição demonstra que a LLC é uma doença predominantemente do idoso com aumento exponencial na incidência da LLC com o avançar da idade sendo trezentas vezes mais comum aos 80 anos que aos 40 anos (DIEHL et al., 1999).

Uma estimativa de 15.340 novos casos foi feita para o ano de 2007 com 4.500 óbitos (*Cancer Facts and Figures*, 2007). O risco de qualquer indivíduo nascido atualmente desenvolver a LLC durante a sua vida é de 0,45% ou 1 caso em cada 221 indivíduos (SEER, 2007). A incidência de LLC tem caído 1,9% por ano desde 1992 (*Cancer Facts and Figures*, 2006) apesar das melhorias nos métodos diagnósticos que contribuíram para o diagnóstico precoce. Segundo cálculos baseados nas mudanças anuais das taxas (APC, *Annual Percentage Change*), para os próximos anos há uma tendência de queda de 0,7% e de 1,1% na incidência e mortalidade da LLC, respectivamente (SEER, 2007).

A LLC representa 22 a 30% de todas as leucemias, aproximadamente 11% dos linfomas não-Hodgkin e 0,8% de todas as neoplasias, com uma incidência mundial projetada entre <1 e 5.5 por 100.000 pessoas. Há um predomínio no sexo

masculino, apesar de haver variação de acordo com o país. Nos EUA, a incidência ajustada à idade mostra uma relação M:F de 1,9:1. Além disso, estas taxas variam grandemente de acordo com a origem étnica, os maiores números de casos são registrados na Austrália, EUA, Irlanda, Itália, Suíça e Canadá enquanto no Japão, China e em outros países asiáticos, corresponde a apenas 3% a 5% das leucemias, com uma incidência 26 vezes menor que no Canadá, por exemplo (RADAELLI et al., 2004). Além disso, estudos mostram que os chineses, japoneses, índios americanos, e filipinos residentes nos EUA também apresentam baixa incidência de LLC (tabela 1).

Tabela 1. Taxa de incidência da LLC nos EUA conforme sexo e etnia. (Fonte: SEER, 2007)

Etnias	Homens	Mulheres
Todas as raças	5.5 por 100.000	2.8 por 100,000
Brancos	5.8 por 100.000	2.9 por 100,000
Pretos	4.4 por 100.000	2.1 por 100,000
Asiáticos	1.1 por 100.000	0.6 por 100,000
Hispanicos	2.8 por 100.000	1.3 por 100,000

Dentre as leucemias, a LLC é a que apresenta maiores índices de sobrevida. Nos EUA, a taxa de sobrevida global em 5 anos foi 74,2% no período compreendido entre 1996 e 2003. A sobrevida em 5 anos relacionada ao sexo e à etnia foi 73,5% para homens brancos, 76,8% para mulheres brancas, 52,9% para homens pretos e 65,8% para mulheres pretas. Com estes dados observamos uma leve diferença na sobrevida conforme o sexo, mas uma importante diferença conforme a etnia, sendo significativamente menor na raça negra (SEER, 2007). Diferença na sobrevida também é documentada nas diversas faixas etárias, sendo maior nos indivíduos mais jovens, 83% entre os menores de 65 anos e 68% entre os maiores que esta idade (RADAELLI et al., 2004).

1.4) Etiologia da LLC

A causa da LLC é desconhecida. Poucos estudos existem referentes a fatores ambientais que possam ser atribuídos como causa da LLC e geralmente eles apresentaram fraca associação ou não foram reprodutíveis (KEATING, 2002). O fato da incidência da LLC ser diferente conforme os grupos étnicos presentes em uma mesma área geográfica sugere que fatores ambientais não contribuem para o desenvolvimento da LLC.

Há observações de maior mortalidade entre profissionais que têm contato com borracha, solventes e derivados de petróleo. Outros relatos descrevem incidência aumentada entre tabagistas. Um estudo relatou maior incidência em população rural, mas não há correlações conhecidas entre LLC e pesticidas, luz solar, radiação ionizante ou carcinógenos. Alguns estudos epidemiológicos relatam aumento de LLC em pessoas expostas a campo eletromagnético, mas não está determinado se essa associação reflete uma relação causal (KEATING, 2002; SGAMBATI et al., 2001).

Os vírus não parecem desempenhar papel patogênico. Anticorpos específicos contra o vírus da hepatite C e o DNA viral foram identificados em alguns pacientes, mas estudos recentes falharam em confirmar esta associação. O HTLV-1, o citomegalovírus (CMV), o vírus Epstein-Barr (EBV) e o herpesvirus humano 6 (HHV6), relacionados com alguns tipos de neoplasias linfóides, não estão implicados no surgimento da LLC (KEATING, 2002).

Fatores hereditários parecem contribuir para o desenvolvimento de LLC. Além das diferentes incidências entre as diversas etnias, muitos casos de LLC ocorrem dentro de uma mesma família. A LLC é a leucemia mais frequentemente associada com acometimento familiar. Os parentes em primeiro grau de um paciente com LLC têm risco três vezes maior de desenvolver LLC ou outra neoplasia linfóide que a população geral (KIPPS, 2001). Comumente os indivíduos de uma família que desenvolvem LLC apresentam idades mais jovens, fenômeno denominado de antecipação, compartilham anormalidades citogenéticas, haplótipos e distúrbios imunológicos sugerindo que fatores genéticos familiares contribuem para a leucemogênese. Estes fatores ainda não são conhecidos e nenhum antígeno leucocitário humano (HLA) tem associação com a LLC (KEATING, 2002; SGAMBATI et al., 2001).

1.5) LLC Familiar

A LLC é denominada familiar quando pelo menos dois membros de uma mesma família apresentam a doença. Nos EUA, um levantamento mostrou que a idade ao diagnóstico é menor nos pacientes com história familiar de LLC ($57,9 \pm 12$ anos) do que entre os casos denominados esporádicos ($70,1 \pm 11,9$ anos). Para exemplificar esta diferença, na LLC familiar a incidência da doença abaixo dos 50 anos é maior do que a encontrada na população geral (31% versus 6%, respectivamente), a este fato têm-se referido o termo “antecipação da doença”. Não foi encontrada diferença na incidência conforme o sexo (ISHIBE et al., 2001).

Um outro estudo baseado no banco de dados da população sueca demonstrou que a incidência de outras neoplasias linfóides também está aumentada nos membros de famílias com dois ou mais casos de LLC. Neste estudo, o risco relativo de familiares de pacientes com LLC de desenvolver a doença foi de 7,53, o risco relativo para o desenvolvimento de LNH foi de 1,45 e para o linfoma de Hodgkin 2,36 (GOLDIN et al., 2004).

Pelo descrito, a participação de fatores genéticos na patogênese da LLC parece ter maior influência do que fatores ambientais, a natureza desta predisposição genética permanece desconhecida, nenhuma das alterações genéticas descritas na LLC são comuns a todos os casos e muitas são adquiridas durante a evolução da doença. Diferentemente do que se observa em outras neoplasias linfóides B, nas quais translocações cromossômicas associam protooncogenes com genes da molécula de imunoglobulina, na LLC as anormalidades mais freqüentes são mutações, deleções ou trissomias de significado biológico também desconhecido (DÖEHNER et al., 2000). Portanto, a patogênese da doença ainda não está esclarecida.

1.6) Quadro Clínico

Aproximadamente 25% dos pacientes são assintomáticos e muitos são diagnosticados por linfocitose em exames de rotina ou por linfonodomegalias ou esplenomegalia no exame físico. Outros pacientes apresentam sintomas leves como reduzida tolerância a exercícios, fadiga ou mal estar. Menos frequentemente, quadros infecciosos, geralmente pneumonia, secundários a imunodeficiência, ou

exacerbação de comorbidades pré-existentes podem ser as queixas iniciais. Diferentemente de outros linfomas, a febre, emagrecimento e sudorese noturna, conhecidos como sintomas B, são menos comuns (JOHNSTON, 1999; KIPPS, 2001).

Os linfonodos acometidos geralmente são pequenos, móveis e de consistência firme, as cadeias cervicais e supraclaviculares são envolvidas com maior frequência que as axilares e inguinais. Quando ocorre esplenomegalia, ela comumente é pequena a moderada de forma que o infarto esplênico é incomum. Pode ocorrer hepatomegalia secundária à infiltração leucêmica, mas a conseqüente alteração da função hepática é leve na maioria das vezes e a icterícia colestática é rara, a menos que ocorra compressão extrínseca das vias biliares por aumento de linfonodos. O envolvimento extranodal é freqüente em autópsias, mas raramente resultam em sintomas e são diagnosticados clinicamente (KIPPS, 2001).

Em fases mais avançadas da doença, os pacientes podem apresentar sintomas relacionados à anemia ou sangramentos, por trombocitopenia ou distúrbios da coagulação, que estão relacionadas à infiltração da medula óssea ou à fenômenos autoimunes como anemia hemolítica autoimune, aplasia, púrpura trombocitopênica imunológica, doença de von Willebrand adquirida ou anticorpo anti-fator VIII da coagulação (Hemofilia A adquirida). Raramente, os pacientes podem apresentar síndrome paraneoplásica como síndrome nefrótica, pênfigo paraneoplásico ou angioedema (JOHNSTON, 1999).

1.7) Fatores Prognóstico

A LLC ainda é considerada uma doença incurável, pois a grande maioria dos pacientes recai após atingir remissão com o tratamento atualmente disponível, sendo o transplante alogênico de medula óssea a única terapia potencialmente curativa, mas como a maioria dos pacientes com LLC é idosa e como esta modalidade terapêutica apresenta alta morbidade e mortalidade para pacientes nesta faixa etária, sua aplicação não se justifica (OSCIER et al., 2004)

Apesar das dificuldades terapêuticas, considerando que a maioria dos pacientes são idosos, a LLC apresenta sobrevida mediana longa, aproximadamente 10 anos, de forma que em muitos casos a causa de mortalidade não está

relacionada à LLC. Entretanto, a sobrevida mediana possui pouco valor na avaliação individual de um paciente, principalmente para os casos de pacientes mais jovens, pois o curso clínico da LLC é extremamente variável. Enquanto alguns pacientes apresentam um curso clínico indolente, sem encurtamento da expectativa de vida, outros apresentam doença rapidamente progressiva, com comportamento agressivo e sobrevida inferior a 2 anos após o diagnóstico (MONTSERRAT, 2006).

A variabilidade do curso clínico é uma consequência da frequência com que a doença é diagnosticada em fase pré-clínica e pela diferença na taxa de progressão entre os casos. A identificação precoce dos casos com tendência para rápida progressão da doença é de fundamental importância ao diagnóstico para guiar a conduta médica (OSCIER et al., 2004).

Os sistemas de estagiamento clínico, desenvolvidos por Rai e Binet, estratificaram os pacientes com LLC em três grupos de risco, com sobrevidas diferentes (tabela 2 e 3). Contudo, apesar das suas grande aplicabilidade e vasta utilização para decisão terapêutica na prática médica, estes estagiamentos não conseguem discriminar os casos com risco de progressão. (DIGHIERO & BINET, 2000). Assim estudos para identificação de marcadores celulares e moleculares que predizem o comportamento clínico trouxeram progressos a este respeito. Alguns destes marcadores refletem a da carga tumoral, enquanto outros estão relacionados a aspectos relevantes da patologia molecular na LLC (DIGHIERO, 2005).

O status mutacional do gene IgVH é atualmente o discriminador mais acurado da evolução clínica. Pacientes com IgVH não mutado apresentam progressão de doença três vezes mais rápida do que paciente com IgVH mutado, com sobrevida mediana de menos de 8 anos para o grupo sem mutação e mais de 24 anos para o grupo com mutação (DAMLE, 1999; HAMBLIN, 1999). Devido às dificuldades na utilização do sequenciamento genético para determinação do status mutacional do gene IgVH como rotina na investigação prognóstica dos pacientes com LLC, diversos estudos procuraram marcadores preditores do seu status. Dois marcadores que são fáceis de serem avaliados na rotina laboratorial dos pacientes apresentam correlação inversa com o status mutacional do gene IgVH: o CD38 de superfície e o ZAP-70 intracelular.

Tabela 2. Sistemas de estadiamento clínico da LLC.

Estágios	Características	Percentual de casos
Binet		
A	<3 áreas linfóides*	60
B	>3 áreas linfóides*	30
C	Hemoglobina <10g/dl ou plaquetas <100x 10 ⁹ /l	10
Rai		
0	Apenas linfocitose	30
I	Linfonodomegalias	25
II	Hepato ou esplenomegalia ± linfonodomegalias	25
III	Hemoglobina <11g/dl	10
IV	Plaquetas <100x 10 ⁹ /l	10

* São consideradas cinco áreas linfóides: cervical (unilateral ou bilateral), axilar, inguinal, fígado e baço.

Tabela 3. Correlação entre os estadiamentos de Rai e Binet e estratificação do risco conforme a sobrevida.

Risco de malignidade	Binet	Rai	Mediana de sobrevida
Baixo	A	0	> 10 anos
Intermediário	B	I, II	5 -7 anos
Alto	C	III, IV	1-3 anos

O CD38 é uma proteína multifuncional que atua na superfície celular como ectoenzima e como receptor de membrana. Sua correlação com o status do gene IgVH não é absoluta, em parte por oscilações na sua expressão ao longo do tempo e em parte por controvérsias nos critérios e métodos que determinam sua positividade ou negatividade, são descritos pontos de corte que variam de 5 a 30% em diferentes estudos, alguns utilizando quantificação por citometria e outros por densidade antigênica pela capacidade de ligação de anticorpos. Hamblin et al. (2002) demonstraram que o CD38 possui poder prognóstico independente e Deaglio et al. (2003) sugerem que o CD38 atue como receptor com potencial patogênico

uma vez que são capazes de alterar o influxo d cálcio para o interior da célula, aumento a proliferação e alteram a morfologia celular quando estimulados.

O ZAP-70 (*zeta-associated protein 70Kd*) é uma proteína tirosina kinase descrita em linfócitos T e células natural-killer participante da sinalização intracelular do receptor de células T. A correlação do ZAP-70 com o status do gene IgVH foi demonstrado inicialmente em um estudo de assinatura gênica que encontrou um pequeno número de genes capazes de diferenciar os casos mutados dos não mutados (ROSENWALD, 2001). Na LLC foi demonstrado que a expressão do ZAP-70 está associada à maior capacidade da célula leucêmica em responder aos estímulos externos (CHEN et al., 2005).

Apesar de promissores, a aplicação destes novos marcadores biológicos nas decisões terapêuticas ainda precisa ser estudada e por enquanto só se justificam dentro de ensaios clínicos (MONTSERRAT, 2006).

1.8) Classificação

A correta classificação das neoplasias linfóides é importantíssima para que um diagnóstico adequado e reprodutível, com aplicação clínica que possibilite estimar sobrevida e guiar a decisão terapêutica seja possível. As diversas classificações das neoplasias linfóides utilizadas até alguns anos atrás eram baseadas em diferentes critérios e por isso davam denominações distintas para a mesma patologia, agrupavam diferentemente as doenças e possuíam diferentes aplicações na prática clínica.

Em 1997, a Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizou e ampliou a classificação intitulada REAL (*Revised European and American Classification of Lymphoid neoplasm*) proposta em 1994 pelo grupo internacional de estudos em linfomas. Esta classificação utiliza parâmetros morfológicos, fenotípicos e genéticos que procuram correlacionar cada doença com sua célula de origem e suas biologias com os seus comportamentos clínicos. Assim, várias entidades puderam ser identificadas e classificadas separadamente evitando as confusões que ocorriam em decorrência das diferentes classificações (HARRIS et al., 1999).

O entendimento da classificação da LLC, e dos linfomas, requer um conhecimento básico da ontogenia linfóide normal.

1.8.1) Ontogenia B

As células B normais podem ser reconhecidas em cada estágio do desenvolvimento por características morfológicas, fenotípicas e genotípicas específicas. Na ontogenia do linfócito B, o processamento, a produção e a expressão das moléculas de imunoglobulina (Ig) delineiam os estágios de diferenciação. As moléculas de imunoglobulina são expressas na superfície dos linfócitos B em conjunção com o CD79a (também chamado de Ig α) e o CD79b (também chamado de Ig β) para formar o complexo BCR (B cell receptor), ou são secretadas em forma solúvel como anticorpos circulantes (PARHAM, 2001a).

As imunoglobulinas são compostas por duas cadeias pesadas (IgH, H = heavy) e duas cadeias leves (IgL, L = light). Tanto as cadeias pesadas quanto às cadeias leves possuem uma porção constante (C_H e C_L) e uma porção variável (V_H e V_L). As porções constantes das cadeias pesadas determinam o isotipo e as propriedades biológicas das moléculas de imunoglobulina: M, D, G, E ou A, que são formadas pelas seguintes cadeias pesadas, respectivamente, mü (μ), delta (δ), gama (γ), épsilon (ϵ), ou alfa (α), que podem estar combinadas a uma das duas cadeias leves, kappa (κ) ou lambda (λ). As porções variáveis formam o sítio de ligação ao antígeno e são compostas por diferentes segmentos de gene. Para compor a região variável das cadeias leves existem os segmentos V_L (variável) e J_L (juncional) e, para as regiões variáveis da cadeia pesada existem, além dos segmentos V_H e J_H, o segmento D (diversidade). Há, no nosso genoma, aproximadamente 51 diferentes genes para o segmento V_H, seis genes para o segmento J_H, vinte e sete genes para o segmento D, quarenta genes para o segmento V_L e cinco genes para o segmento J_L, o que possibilita mais de um milhão de diferentes combinações (PARHAM, 2001a).

A primeira classe de imunoglobulina expressa é a IgM; tão logo ela aparece na membrana celular, este linfócito B imaturo sofre na medula óssea um processo de seleção negativa frente à auto-antígenos denominado deleção clonal. Após esta etapa, as células B circulam do sangue periférico aos tecidos linfóides secundários onde se congregam em estruturas organizadas denominadas folículos linfóides primários. Nestes folículos elas recebem sinais de sobrevivência de células acessórias denominadas células dendríticas foliculares para novamente retornar ao sangue via vasos linfáticos. Neste momento do desenvolvimento linfóide, estas células são denominadas *naïve* ("virgens" - células B maduras que ainda não

sofreram estimulação antigênica) e começam a expressar também imunoglobulinas da classe IgD na superfície (PARHAM, 2001a, 2001b).

Os linfócitos B *naive* têm meia vida curta e entram em apoptose se não encontrarem seus antígenos ou se não conseguirem estímulos nos folículos linfóides primários. Quando ocorre o encontro com antígenos livres (geralmente polissacarídeos ou lipopolissacarídeos) ou apresentados por células acessórias (geralmente antígenos protéicos), estes linfócitos são ativados nos órgãos linfóides secundários (PARHAM, 2001b).

Os tecidos linfóides secundários fornecem os sítios onde as células B *naive* encontram o seu antígeno específico. Quando isto ocorre a células B fica retida na região paracortical (zona do manto - rica em linfócitos T) onde é ativada por células T CD4 auxiliar para se diferenciar em plasmócito de vida curta secretor de IgM polireativo, para uma resposta rápida, ou para formar o folículo linfóide secundário (rico em células B) com um centro germinativo, onde assumem morfologia blástica (centroblastos) e proliferam. Esses amadurecem em células B que não se dividem (centrocitos) e que refinam sua molécula de imunoglobulina a fim de aumentar sua especificidade ao antígeno para uma resposta tardia, porém específica: sofrem troca de isotipo (troca de classe) e mutação da porção variável da Ig (hipermutação somática). Aqueles centrocitos que expressam imunoglobulina com maior afinidade pelo antígeno são selecionados, sofrem nova proliferação para expansão do clone e migram para a medula óssea onde completam sua diferenciação em plasmócitos de vida longa, secretores de Ig de alta afinidade, ou migram para outros locais no órgão linfóide onde se tornam células B de memória com receptores de alta afinidade. As células de memória persistem em repouso por longos períodos de tempo e, na recirculação do antígeno, podem ser reativadas produzindo resposta rápida e específica (PARHAM, 2001b; PASCUAL, 1994).

Os linfócitos B são divididos nos subtipos B-1 e B-2 conforme seu fenótipo, sua localização anatômica e suas propriedades funcionais. O subtipo B-2, que representa a maioria dos linfócitos da vida adulta predomina no baço e linfonodos, surge mais tardiamente na ontogenia e é mantido a partir de precursores hematopoéticos da medula óssea. Em contraste, os linfócitos B-1 surgem primeiro na ontogenia linfóide, no omento fetal; no adulto eles representam pequeno percentual dos linfócitos esplênicos, estão praticamente ausentes no sangue periférico, medula óssea e linfonodos, mas predominam nas cavidades pleurais e

peritoneal. Eles mantêm seu número por auto-renovação, divisão celular de células maduras (GHIA & CALIGARIS-CAPPIO, 2001).

Os linfócitos B-1 subdividem-se ainda em B-1a e B-1b, que apresentam as mesmas características funcionais e fenotípicas, diferindo apenas quanto à origem e à expressão do antígeno CD5. O linfócito B-1a é CD5+ surge de progenitores peritoneais que diminuem com o avançar da idade e adquirem capacidade de auto-renovação, o linfócito B-1b é CD5- e surge de precursores da medula óssea que persistem na vida adulta (GHIA & CALIGARIS-CAPPIO, 2001).

Nos humanos, estes linfócitos B-1 são os primeiros linfócitos B a surgir no fígado fetal e nos linfonodos em desenvolvimento. Eles representam a maioria dos linfócitos B circulantes no feto e em neonatos, mas eles vão diminuindo à medida que envelhecemos. Estes linfócitos B-1 são células que participam da resposta imune inata por interagirem com antígenos livres da cavidade peritoneal (ou na zona do manto folicular onde se localizam preferencialmente quando presentes nos linfonodos), como resultado não sofrem hipermutação da imunoglobulina, produzindo anticorpos de baixa afinidade, com polireatividade, por vezes auto-reativos, e que podem causar algumas doenças auto-imunes. Não está claro se em humanos adultos estas células constituem uma linhagem distinta proveniente de progenitores próprios remanescentes da vida fetal uma vez que reaparecem durante o transplante de medula óssea, como ocorre em murinos. Outra hipótese é que a expressão do CD5 representaria um marcador de ativação uma vez que a expressão do CD5 pode ser induzida ou diminuída por estímulos exógenos (linfócito B de memória que foram estimulados localmente a partir de antígenos do trato gastrointestinal) (GHIA & CALIGARIS-CAPPIO, 2001).

1.8.2) A origem do linfócito leucêmico

Os avanços no conhecimento tanto da ontogenia B quando da biologia da LLC têm permitido a descoberta de dados que trouxeram progressos na identificação dos casos com tendência para progressão da doença. Contudo, as estas novas informações a respeito dos linfócitos leucêmicos, suas interações, seu microambiente e sua capacidade de responder a estímulos levam a hipóteses que

têm alterado totalmente os conceitos sobre a LLC, sua origem celular e seu mecanismo de sobrevivência.

Morfologicamente, o linfócito leucêmico é pequeno e arredondado, o seu citoplasma é escasso, agranular e cora-se de azul claro enquanto o núcleo aparece azul escuro (basofílico) na coloração de rotina por ter cromatina densa, raramente apresenta nucléolos e ocupa quase todo o citoplasma. Pode ser encontrada também pequena porcentagem de células com morfologia atípica, núcleo clivado, tamanho grande ou semelhante à prolinfócitos (HAMBLIN, 1997).

Eles possuem em sua superfície os antígenos CD19, CD21, CD24, CD25 e CD40, porém sua principal característica é a concomitante expressão de CD5 e CD23 com fraca expressão do CD20, CD22, CD79b e imunoglobulina de superfície (slg) e ausência de FMC7 que auxilia na distinção com outras DLPC. As slg geralmente são da classe M ou M e D, sem preferências quanto à cadeia leve (κ ou λ) (JURLANDER, 1998).

Outras características peculiares são a capacidade de formar rosetas com hemácias de camundongos e a expressão de antígenos mielomonocíticos (CD11). A maioria dos linfócitos está na fase G0 do ciclo celular e os poucos que entram no ciclo celular estão na fase G1 como foi identificado pela baixa expressão de Ki67 (HAMBLIN, 1997; JURLANDER, 1998).

Pelas características descritas, os linfócitos leucêmicos se assemelham aos linfócitos B circulantes que expressam apenas IgM (com ou sem IgD) e que estão fora do ciclo celular, desta forma a LLC era classificada como uma neoplasia de linfócitos *naïve* (PASCUAL, 1994). No entanto, o fenótipo CD19/CD21+ e CD23+ sugere um fenótipo de célula ativada o que contradiz o padrão de repouso apresentado pelo ciclo celular (HAMBLIN, 1997). Da mesma forma que na ontogenia normal, não está bem estabelecido se a expressão do CD5 na célula leucêmica representa origem de linfócito B-1 ou mais um marcador de ativação celular (GHIA & CALIGARIS-CAPPIO, 2001).

Alguns estudos avaliaram o status mutacional do gene da porção variável da cadeia pesada de imunoglobulina (V_H) com o objetivo de estabelecer o estágio de diferenciação dos linfócitos leucêmicos. Eles apresentaram resultados divergentes, enquanto alguns casos o apresentavam mutado, sugerindo que estes linfócitos tenham sofrido estimulação antigênica e tenham se originado de células que passaram pelo centro germinativo onde expressam CD38, IgD, e fazem troca de

classe de imunoglobulina e sofrem as mutações somáticas no gene da porção V_H (DAMLE et al., 2002; FAIS et al., 1998), outros possuíam semelhança com o gene da linha germinal (não mutado), contribuindo para a idéia da origem em linfócitos naive ou de linfócitos B-1 da zona do manto folicular que normalmente expressam CD5, CD23, são negativos para CD38, coexpressam IgM e IgD e utilizam genes V_H não mutados (SCHROEDER & DIGHIRO, 1994). Uma terceira hipótese sugere que os linfócitos leucêmicos representem linfócitos B da zona marginal que podem ser mutados ou não mutados; embora as células da zona marginal não expressem o CD5, nesta hipótese sua positividade nas células leucêmicas seria consequência da ativação celular (CHIORAZZI & FERRARINI, 2003).

Assim, especulou-se que os dois subtipos poderiam surgir de diferentes estágios de diferenciação, e alguns autores defendiam a hipótese de que poderia se tratar de duas patologias distintas uma vez que possuem diferenças epidemiológicas e de prognóstico e o perfil mutacional dos genes V_H estão associados com alterações genéticas específicas. Entretanto, independentemente do subtipo, os linfócitos leucêmicos expressam IgM e IgD, CD5 e CD23. E, ao contrário do que seria esperado, os linfócitos leucêmicos do subtipo não mutado são os que apresentam predominância na expressão do CD38 (GHIA et al., 2003), na troca de classe de imunoglobulina e na expressão constitutiva de citidina deaminase, uma enzima que desempenha papel fundamental nos processos de troca de classe e de mutação somática do gene V_H nas células do centro germinativo e não é normalmente expressa em linfócitos B circulantes (OPPEZZO et al., 2003).

Estudos recentes utilizando microarrays demonstraram que a LLC possui uma expressão gênica característica (assinatura), que comparado aos diversos estágios de diferenciação dos linfócitos normais é mais relacionado aos linfócitos de memória. Quando analisados isoladamente, apenas a expressão de um pequeno número de genes separa os subtipos mutados dos não mutados de forma que eles se assemelham mais proximamente um com o outro do que com qualquer linfócito nos diferentes estágios de diferenciação (KLEIN et al., 2001; ROSENWALD et al., 2001). Estes resultados sugerem que os casos mutados indolentes e os não mutados agressivos constituem duas variantes da mesma doença e as razões para as diferenças na história natural permanecem desconhecidas, assim como se eles correspondem a diferentes estágios de diferenciação no momento da transformação

maligna ou se o subtipo não mutado está em uma forma mais ativada que favorece o potencial proliferativo do clone maligno.

Os resultados de novos estudos cada vez mais se opõem a hipótese de que os linfócitos leucêmicos corresponderiam a células *naive*. Dentro de um mesmo subgrupo de LLC ocorre o uso preferencial de determinados genes da imunoglobulina (FAIS et al., 1998), este uso preferencial frente a mais de um milhão de combinações possíveis fortemente sugere o papel de um antígeno estimulador. O subgrupo não mutado expressa citidina deaminase (OPPEZZO et al., 2003) que, na fisiologia normal, é induzida pela estimulação de células apresentadoras de antígenos via CD40 ligante (CD40L). O fenótipo das células leucêmicas relembra linfócitos ativados por antígeno com hiperexpressão de marcadores da ativação: CD23, CD25, CD69, e CD71 e hipoexpressão do CD22, CD79b e da slg que são *downregulados* pela ativação celular (DAMLE et al., 2002). Ademais, o CD27, um identificador de células de memória, está uniformemente expresso pelos linfócitos leucêmicos.

Além disso, os linfócitos leucêmicos apresentam telômeros mais curtos do que os observados em linfócitos B normais. Quando analisados os subtipos de LLC, os casos não mutados apresentaram telômeros mais curtos do que os casos mutados e maior atividade de telomerase. Portanto, as células sem mutações somáticas passam por um número maior de divisões celulares, possivelmente após múltiplas exposições a estimulação antigênica, que expõem as células não mutadas a uma gama muito maior de oportunidade para adquirir aberrações cromossômicas, e, portanto, de apresentar um curso clínico mais agressivo. É possível que as células com mutação somática, com maiores telômeros e menor atividade de telomerase, tenham uma menor capacidade de interagir com antígeno, o que conduziria a célula a um estado de reduzida capacidade de proliferar, ou seja, de anergia. Dado o menor número de divisões, a chance de que estas células adquiram aberrações genéticas é menor e, portanto, isto poderia refletir o melhor prognóstico deste grupo de indivíduos (DAMLE et al., 2004).

Outra característica dos linfócitos leucêmicos que sugere a participação de antígenos é a fraca expressão de imunoglobulina de superfície (BCR). Ela se correlaciona com reduzida sinalização intracelular, portanto baixa resposta aos estímulos externos via BCR (LANHAM et al., 2003; STEVENSON & CALIGARIS-CAPPIO, 2004). Não está esclarecido se esta fraca expressão do BCR está

relacionada ao evento de transformação maligna ou se é um processo de anergia que normalmente ocorre em consequência do cruzamento com auto-antígenos, uma vez que com frequência o BCR dos linfócitos leucêmicos são autoreativos. A elucidação do mecanismo implicado na hipoexpressão do BCR deve ser uma importante chave para entender a patogênese.

Estudos recentes avaliando a capacidade de sinalização intracelular revelaram que os casos não mutados tendem a apresentar maior quantidade de BCR e responder melhor a estimulação (STEVENSON & CALIGARIS-CAPPIO, 2004). Estes resultados sugerem que o subtipo não mutado mantém a capacidade de responder aos estímulos externos enquanto os mutados relembram células B anérgicas. Uma molécula tirosina quinase, denominada ZAP-70, que participa na transdução de sinais de receptores de membrana em linfócitos T, foi detectada nos casos não mutados (CRESPO et al., 2003) que são mais aptos a responder aos sinais após estimulação via IgM. Foi demonstrado que a expressão do ZAP-70 permite sinalização mais efetiva via IgM nos linfócitos leucêmicos, uma característica que parece contribuir para o curso mais agressivo observado no subtipo não mutado (CHEN et al., 2005).

1.9) Biologia da LLC

Até recentemente, acreditava-se que a principal característica biológica dos linfócitos leucêmicos era a resistência à apoptose, como descrito por Galton e Dameshek em 1966. Diversos estudos demonstraram aumento da relação entre os inibidores da apoptose, como o BCL-2, e seus indutores, Bax e Bak. Isto condizia com o quadro clínico indolente da maioria dos casos, nos quais o acúmulo gradual de linfócitos só manifestaria sintomas em fase tardia da doença caso o diagnóstico não ocorresse acidentalmente em exames de rotina. Curiosamente, esta resistência a apoptose desaparece quando estas células são semeadas *in vitro*, onde rapidamente morrem (COLLINS et al., 1989). Tal fato foi motivo de muitos estudos que demonstraram que fatores extrínsecos ao linfócito leucêmico influenciam a sua sobrevivência e nos leva a concluir que as anormalidades da apoptose, antes descritas como mecanismo patogênico fundamental desta doença, devem ser

secundárias aos estímulos recebidos pelos linfócitos leucêmicos (KEATING et al., 2003).

Ao contrário do que se acreditava, os linfócitos leucêmicos possuem atividade proliferativa, o maior exemplo desta proliferação é a progressão clínica que cedo ou tarde ocorre em consequência do aumento do número de linfócitos leucêmicos. A doença progressiva é caracterizada por um rápido aumento do número de linfócitos leucêmicos que resulta em um tempo de duplicação linfocitária menor que um ano. Todavia, se os linfócitos leucêmicos encontrados no sangue periférico estão no estágio G0/G1 do ciclo celular e são negativos para Ki67, estas células devem possuir um microambiente apropriado onde proliferam (RICHARDSON et al., 2006).

1.9.1) O Microambiente

Diversas quimiocinas desempenham importante papel na proliferação e sobrevivência do linfócito leucêmico. Linfotóxina- α (KULMBURG et al., 1998), IL-4 (DANCESCU et al., 1992; MAINOU-FOWLER et al., 1994; PANAYIOTIDIS et al., 1994), IL-8 (DI CELLE et al., 1994), IL-13 (CHAOUCHI et al., 1996), INF- α (PANAYIOTIDIS et al., 1993; JEWELL et al., 1994) e INF- γ (BUSCHLE et al., 1993) inibem a apoptose dos linfócitos leucêmicos e prolongam sua sobrevivência em cultura por induzir a expressão da proteína BCL-2. Estas quimiocinas podem ser produzidas por leucócitos acessórios ou pelas próprias células leucêmicas exercendo um controle parácrino e autócrino (HOFFBRAND et al., 1993). Entretanto, o soro ou o plasma dos próprios pacientes não é capaz de sustentar a sobrevivência dos linfócitos leucêmicos *in vitro* (HAMBLIN, 1997), o que sugere que os fatores humorais que sustentam estas células *in vitro* não são responsáveis pela sobrevivência *in vivo* e que outros fatores devam exercer esta função.

Alguns estudos demonstraram que as interações com outros tipos celulares têm um papel importante na prevenção da apoptose do linfócito leucêmico *in vitro*:

A) Células *nurse-like* (NLCs) – Células acessórias foram demonstradas em estudos de co-cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LLC (BURGER et al., 2000). O desenvolvimento destas NLCs dependeu da presença de células CD14⁺ (monócitos) que sofreram modulação da expressão de

algumas moléculas, como regulação negativa do CD14 e CD33 e regulação positiva do CD68, representando um tipo celular distinto que surge na LLC. Estas células não expressam o CD106 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*), molécula de adesão das células estromais e dendríticas foliculares pela qual as células B normais e malignas se ligam via VLA-4 (*very late antigen-4*), sugerindo mecanismo especial de interação com o linfócito leucêmico (TSUKADA et al., 2002). As NLCs, protegem os linfócitos leucêmicos por mecanismo dependente da quimiocina SDF-1 (*stromal derived factor-1* ou CXCL12) e seu receptor CXCR4. A adição de SDF-1 em culturas de linfócitos leucêmicos praticamente inibe a apoptose enquanto a adição de anticorpos anti-CXCL12 bloqueia a proteção das NLCs (BURGER et al., 2000). Não está claro como a ligação CXCL12-CXCR4 induz o efeito protetor, mas em linfócitos T expostos ao CXCL12 ocorre rápida ativação das cinases reguladoras de sinais extracelulares (ERK) p44/42 que constituem importante via de promoção da sobrevivência celular, esta sinalização depende do ZAP-70, uma tirosina cinase que participa na transmissão de sinais intracitoplasmático originados na membrana celular (RICHARDSON et al., 2006). As NLCs já foram identificadas nos órgãos linfóides de pacientes com LLC, sugerindo que elas desempenham papel na proteção dos linfócitos leucêmicos *in vivo*.

B) Interação homotípica - nos linfonodos acometidos pela LLC, os linfócitos leucêmicos associam-se uns aos outros, sugerindo que interações homotípicas sejam importantes na sobrevivência deles. Um estudo *in vitro* analisando diferentes situações de cultura do linfócito leucêmico descreve que as condições de cultura que permitem melhor aproximação de uma célula com a outra são capazes de manter a viabilidade por mais tempo (PETTITT et al., 2001). Recentemente, tanto uma quimiocina quanto o seu receptor foram descritos na superfície do linfócito leucêmico, sugerindo ação autócrina e parácrina. Esta proteína pertence à família do TNF (tumoral necrosis factor) e recebe o nome de BAFF (*B-cell Activating Factor of TNF-Family*) por ser essencial para o desenvolvimento das células B e, *in vitro*, é responsável pela sobrevivência e proliferação de células B (KERN et al., 2004).

C) Linfócitos T e Células Dendríticas Foliculares - A medula óssea e linfonodos dos pacientes com LLC apresentam um infiltrado linfocitário monomórfico que distorce a arquitetura normal do tecido (VEGA et al., 2002), mas ocorre também

formação de pequenos agregados, chamados pseudofolículos ou centros de proliferação, composto por células de maior tamanho, com cromatina frouxa e nucléolo evidente, delimitados por neovascularização. Nestes pseudofolículos, os linfócitos leucêmicos em proliferação, identificados pela expressão de Ki67, estão organizados em clusters ao redor de linfócitos T e de células dendríticas foliculares. Eles diferem dos linfócitos leucêmicos do sangue periférico por apresentarem positividade mais forte ao CD20 e CD23 e diferem também dos linfócitos B normais em proliferação no centro germinativo por serem CD10-, BCL-6- e BCL-2+ (CALIGARIS-CAPPIO, 2003).

Um possível mecanismo de trânsito do linfócito leucêmico entre o sangue periférico, medula óssea e órgão linfóides é via o CCR7 (receptor de quimiocina que regula a migração de células B, T e dendríticas para os linfonodos) que está hiperexpresso e resulta em capacidade aumentada dos linfócitos leucêmicos migrarem em resposta ao CCL21, ligante do CCR7 que é expresso pelas células das vênulas endoteliais altas (*high endothelial venules*) dos linfonodos (LÓPEZ-GIRAL et al., 2004; TILL et al., 2002). Outro estudo demonstrou que linfócitos T CD4+ estimulam os linfócitos leucêmicos via CD40L a liberar as quimiocinas CCL17 e CCL22 cujo receptor é o CCR4 presente nos linfócitos T CD4+/CD40L+. Estes dados sugerem que os linfócitos leucêmicos atraem linfócitos T que, por sua vez, estimulam a proliferação leucêmica, o que induz o recrutamento de mais linfócitos T promovendo um ciclo de proliferação (GHIA et al., 2002).

Ademais, várias das quimiocinas que podem inibir a apoptose do linfócito leucêmico são produzidas pelas células T. Granziero et al. (2001) mostraram que a interação CD40/CD40L está relacionada com a modulação e expressão de survivina pelos linfócitos leucêmicos *in vitro*. A survivina é uma proteína da família de inibidores da apoptose (IAP, *inhibitor of apoptosis proteins*) que controla a apoptose e participa da progressão do ciclo celular. Ela é expressa pelos linfócitos dos centros de proliferação, mas raramente está presente nos linfócitos leucêmicos do sangue periférico. Nestes casos observou-se doença mais agressiva e, portanto, a expressão das IAPS pode ter significado prognóstico.

D) Células estromais - Células estromais de diferentes microambientes também interagem com os linfócitos leucêmicos. Estas interações são responsáveis por alguns padrões de infiltração tecidual *in vivo* que refletem a apresentação clínica

(HAN et al., 1984; PANGALIS et al., 1984). Alguns casos estão associados a vasto acometimento ganglionar enquanto o sangue periférico é pouco envolvido.

A migração dos linfócitos leucêmicos depende de mecanismos que controlam o tráfego entre microambientes distintos e as quimiocinas e seus receptores participam destes mecanismos. O local preferencial de colonização dos linfócitos leucêmicos é a medula óssea, de forma que a infiltração medular é obrigatória para o seu diagnóstico e o grau de infiltração correlaciona-se com o estágio clínico e o prognóstico (HAN et al., 1984; PANGALIS et al., 1984). Panayiotidis et al. (1996) e Lagneaux et al. (1998) estudaram a interação entre células estromais e os linfócitos leucêmicos e mostraram que esta interação é capaz de inibir a apoptose dos linfócitos leucêmicos *in vitro* e que isto independe da presença de fatores de crescimento exógenos, mas requer a adesão dos linfócitos leucêmicos ao estroma.

O estroma medular dos pacientes com LLC produz mais SDF-1 que o estroma de indivíduos normais (LAGNEAUX et al., 2000). Além disso, ocorre uma resposta funcional aumentada ao SDF-1, devido ao aumento da expressão do CXCR4 (receptor desta quimiocina) nos linfócitos leucêmicos (MOHLE et al., 1999). Burger et al. (1999) mostraram que a interação SDF-1/CXCR4 media a migração *in vitro* dos linfócitos leucêmicos por entre as células estromais que secretam esta quimiocina.

A migração dos linfócitos leucêmicos para um microambiente propício depende da interação quimiocina/receptor celular e de moléculas de adesão. Além do CXCR4, os linfócitos leucêmicos expressam também o CXCR3 (JONES et al., 2000; TRENTIN et al., 1999), receptor de citocinas inflamatórias normalmente não expresso em linfócitos B, e o CXCR5, receptor do BCA-1, *B-cell attracting chemokine*, que tem importante papel na homeostasia de tecidos linfóides secundários (BURKLE et al., 2007; CHUNSONG et al., 2006; JONES et al., 2000). As moléculas de adesão presentes nos linfócitos leucêmicos são: β 1 (CD29) e β 2 (CD18) integrina (que fazem a interação com o estroma), quantidades variáveis de α 3 integrina (CD49c), α 4 integrina (CD49d, que compõe o VLA-4) e α 5 integrina (CD49e), antígeno-1 associado à função leucocitária (LFA-1, integrina α β 2 ou CD11a/CD18), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1 ou CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), L-selectina (CD62L) e CD44 (CALIGARIS-CAPPIO & HAMBLIN, 1999).

Portanto, as células não neoplásicas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da doença, de tal forma que a sobrevivência dos linfócitos leucêmicos depende do contato direto célula-célula. Um microambiente favorável expõe os linfócitos leucêmicos a sinais adicionais de sobrevivência e esta comunicação tumor-microambiente vem sendo um dos focos de estudo mais ativos na compreensão da patogênese desta doença. Assim, temos evidências suficientes para pensar que a LLC é uma doença que depende de um balanço entre proliferação e apoptose e este balanço é diretamente influenciado pelo microambiente onde se encontra a célula. Os estímulos oriundos dos microambientes determinam o comportamento biológico: morte ou proliferação celular.

1.9.2) O Estroma da medula óssea

A hematopoese ocorre na medula óssea nos espaços extravasculares, entre os seios venosos, onde as células hematopoéticas se encontram em íntima associação com o estroma formando o microambiente medular (WEISS, 1976). O microambiente medular é indispensável para a definição do destino celular ao longo da diferenciação hematopoética, pois provê a maioria dos fatores requeridos para o ordenado desenvolvimento das células progenitoras (DORSHKIND, 1990; VERFAILLIE, 2000). Ele é composto pelas próprias células hematopoéticas e o estroma. O estroma por sua vez é constituído de células estromais (fibroblastos, adipócitos, miofibroblastos, células endoteliais, células dendríticas e macrófagos) e a matriz extracelular (MEC) por elas produzida (VERFAILLIE, 2000). A matriz extracelular possui proteínas, fatores de crescimento e quimiocinas livres ou associadas às proteínas da matriz que se organizam espacialmente de maneira heterogênea (NILSSON et al., 1998). As diversas linhagens hematopoéticas também se distribuem em distintos espaços denominados “nichos progenitores” (JACOBSEN & OSMOND, 1990; NILSSON et al., 2001; QUESENBERRY et al., 1994). Esta localização diferenciada das linhagens hematopoéticas ocorre porque o contato das células progenitoras com o microambiente de sustentação induz divisões assimétricas destes progenitores formando um microambiente compartimentalizado (PUNZEL et al., 2003).

A interação das células hematopoéticas com o estroma medular é mediada pela ação de quimiocinas e fatores estimuladores de colônias e pelo contato célula-célula e célula-matriz. Moléculas de adesão e quimiocinas são fundamentais para o reconhecimento do microambiente adequado, ativação celular, migração para o seu interior e interação com os componentes celulares, humorais e de matriz extracelular que caracterizam este microambiente (KUMAR, 1998). Por exemplo, o SDF-1, produzido pelo estroma, se dispersa no meio extracelular formando um gradiente de concentração, as células que o captam são ativadas, sofrem alterações do citoesqueleto e migram para o estroma aonde farão adesão e interiorização, seguindo este gradiente (BLEUL et al., 1996). O contato célula-célula ocorre através da expressão de ligantes da família das integrinas (como o VLA-4), da superfamília das imunoglobulinas (como o VCAM-1), da família das selectinas, de receptores de heparan sulfato ou de receptores de fatores de crescimento (SCF, *stem cell factor*) na superfície celular (PELED et al., 2000).

No caso da linfopoese, os linfócitos B distribuem-se ao longo da medula num gradiente de diferenciação no qual as células mais imaturas se encontram próximas à região subendosteal migrando para as regiões centrais à medida que maturam (JACOBSEN & OSMOND, 1990). O SDF-1 participa diretamente da linfopoese B, de forma que em cobaias com deficiência deste fator ou de seu receptor ocorre grave defeito na geração de linfócitos B, mas não de linfócitos T (NAGASAWA et al., 1996). O SDF-1 regula a linfopoese B por atuar como fator de crescimento para as células B (NAGASAWA et al., 1994) e por manter os precursores B em íntimo contato com as células estromais dentro de um microambiente propício, prevenindo sua liberação prematura na circulação (MA et al., 1999). Na maturação linfóide, o estroma também tem papel fundamental para a seleção positiva dos linfócitos B que produziram rearranjo VDJ adequado. Estes linfócitos escapam da apoptose por interagir com o estroma e expressar proteínas inibidoras da apoptose, tal como o BCL-2 (MELCHERS et al., 1995; OSMOND et al., 1994).

Mimetizando o que ocorre *in vivo*, o estroma medular sustenta o crescimento de precursores hematopoéticos e linfóides normais em cultura (KIERNEY & DORSHKIND, 1987). Whitlock e Witte (1982) desenvolveram um sistema de cultura de longa duração de células B, denominada de cultura de Whitlock e Witte em função de seus descobridores, onde a linfopoese é sustentada pelas células estromais que formam uma monocamada no frasco de cultura. Neste sistema de

cultura, as células B migram espontaneamente por entre as células do estroma medular (pseudo-emperipoese) e podem localizar-se por entre projeções das membranas destas. Esta migração é mediada principalmente pelo VLA-4, e o bloqueio deste inibe a migração e a proliferação dos precursores de células B (WITTE et al., 1987).

Desta forma, o microambiente medular possui características muito particulares que permitem a manutenção de subpopulações de precursores hematopoéticos em quiescência e em proliferação e diferenciação. Com base nisto, é possível imaginar que estas interações sejam importantes nas doenças onco-hematológicas e contribuam para a manutenção de clones transformados, principalmente em neoplasias de linhagem linfóide, uma vez que todos os processos fisiológicos que envolvem as células B normais ocorrem em sítios anatômicos apropriados e dependem de complexas interações com populações de células acessórias localizadas em microambientes específicos. Vega et al. (2002) mostraram que as síndromes linfoproliferativas B crônicas têm diferentes relações com o estroma medular: modulam diferentemente a expressão de marcadores de superfície das células estromais, estão associados com variável proliferação vascular, variável densidade de células estromais e diferenças topográficas na relação entre linfócito maligno e o estroma e algumas mantêm contato com a arquitetura estromal preexistente enquanto outros a distorcem, de forma que cada síndrome linfoproliferativa B crônica pode ser reconhecida pela combinação do padrão de crescimento e composição celular na análise histopatológica da medula óssea (HENRIQUE et al., 1999).

1.9.3) Organização tridimensional do microambiente *in vitro*

Os experimentos de cultura são importantes para entender as bases do comportamento celular. A técnica de cultivo tradicional, em placas, contribuiu grandemente para ampliar os conhecimentos de biologia celular e permitiu o desenvolvimento de várias áreas como bacteriologia, microbiologia e a própria biologia celular e molecular. No entanto, os modelos de cultivo bidimensional estão longe de mimetizar o que ocorre *in vivo*, onde a interação celular com seu microambiente é complexa, dinâmica, composta por sinalização provenientes do tecido ao redor em todas as direções da superfície da membrana celular e envolvem

modulação de moléculas de adesão, citocinas, enzimas proteolíticas e reguladores da organização do citoesqueleto. Tanto sinais inibitórios quanto estimulatórios são recebidos pelas células constantemente e o resultado destes estímulos é a migração, diferenciação, proliferação ou apoptose (LAMBERT et al., 2001; ROSSI et al., 2005).

As células estão conectadas às células vizinhas e à matriz extracelular em uma intrincada rede tridimensional que não é reproduzida nos sistemas convencionais de análise *in vitro* (ROSSI et al., 2005). A interação entre células e matriz é feita por receptores na membrana que ancoram o citoesqueleto dessas células à matriz extracelular e desencadeiam mudanças conformacionais com ativação de vias de sinalização e modulação do comportamento da célula em questão (BOUDREAU & JONES, 1999; SCHWARTZ et al., 1995).

Estas mudanças no formato celular estão restabelecidas nos modelos 3D de cultura, enquanto nas culturas 2D as células sofrem uma falsa polarização entre a porção aderida ao plástico e a porção superior em contato com o meio de cultura (KUNZ-SHUGHART et al., 1999). A Figura 1 ilustra esta polarização que gera um formato celular espreado e completamente diferente do encontrado *in vivo*, ao contrário do que ocorre nas culturas em 3D, que permitem um formato assimétrico, próximo do real.

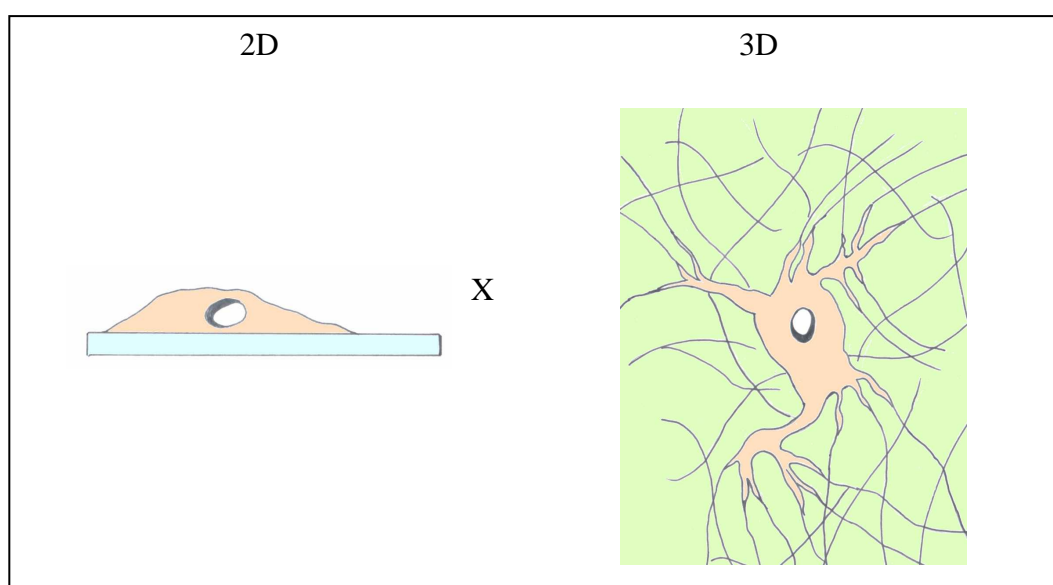


Figura 1. Ilustração comparativa da morfologia celular nos sistemas de cultura bidimensional e tridimensional. A cultura bidimensional apresenta uma polarização

artificial enquanto a cultura tridimensional apresenta formato assimétrico sem polarização induzida (Fonte: BARROS, A.P.D.N., 2007).

Diversos experimentos têm mostrado resultados distintos entre os estudos em 2D e 3D (FRANKEL et al., 1997; KLUNDER & HÜLSER, 1993; WEAVER et al., 1997; WOLF et al., 2003), com isso acredita-se que houve grande atraso no desenvolvimento do conhecimento enquanto os esforços atuais são baseados nas descobertas dos modelos 2D. Como exemplo, baseados nos conceitos estabelecidos sobre metástase e migração celular que classicamente depende da secreção de enzimas que digerem moléculas da matriz (metaloproteinases - MMPs), muito testes clínicos com administração de inibidores destas enzimas falharam em encontrar resultado favorável (OVERALL & LÓPEZ-OTÍN, 2002). Em experimento 3D foi observado que na presença destes inibidores as células continuavam migrando através de movimento amebóide, por entre as fibras de colágeno (WOLF et al., 2003).

Atualmente, pesquisadores tentam aperfeiçoar sistemas de cultura tridimensional. Em 2003 o Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCI, *National Cancer Institute*) lançou um programa em microambiente celular focado em estudos 3D que já possibilitou o desenvolvimento de tecnologia que permite uma organização tridimensional das células que favoreça sua diferenciação e formação de um microtecido com as características morfo-funcionais do tecido original, tais como cartilagem (HUANG et al., 2004), osso (MAUNEY et al., 2004), tendão (FENG et al., 2006), enxertos vasculares (ABILEZ et al., 2006), entre outros.

Existem várias técnicas utilizadas atualmente para cultivo em 3D: Gel de colágeno, gel de matriz extracelular tecidual, matrigel, nanofibras protéicas e esferóide (MCTS, *multicellular tumor spheroids*). Esta última técnica possibilita um modelo de crescimento tumoral *in vitro* para testes com drogas antitumorais (observando a penetração, ligação com o alvo e sua ação), radioterapia e novas combinações de drogas e terapias (KUNZ-SHUGHART, 1999). Alguns experimentos já mostraram resistência de alguns tumores a terapias utilizando a “conformação multicelular”. Outros estudos revelaram que a resistência de um tumor murino a suas drogas pôde ser completamente revertida quando as células foram isoladas e cultivadas em monocamada e restabelecidas se mantidas em cultura como a de esferóide.

A técnica do esferóide é baseada no princípio de adesão inter-celular. Assim, através da formação de uma película inerte (não aderente) na superfície de cultivo, a adesão ao plástico fica impossibilitada e as células aderentes passam a aderir entre si, formando uma estrutura multicelular arredondada, os esferóides (KUNZ-SHUGHART, 1999; MUELLER-KLIESER, 1997). Esta estrutura tridimensional reproduz com maior fidelidade as características encontradas *in vivo*, pois contém uma extensiva matriz extracelular que é diferente tanto na quantidade quanto na disposição dos seus componentes em comparação com a matriz produzida pelas células em monocamada (KUNZ-SHUGHART, 1999).

Uma grande vantagem deste tipo de cultura é a possibilidade de criar um ambiente tridimensional com diferentes tipos celulares (co-cultura) e, portanto, estudar os mecanismos de crescimento, proliferação e diferenciação celulares em um modelo reprodutível com um ambiente interno ditado pelo metabolismo e pelas respostas adaptativas das próprias células. Nosso laboratório demonstrou que, utilizando células do estroma de medula óssea humano, agregados de células se formam em uma rede de fibronectina e reproduzem um microambiente tridimensional quiescente. Na ausência de um meio indutor, as células mantiveram a expressão de α -actina sem formar as fibras de stress observadas em culturas bidimensionais (BARROS, 2007).

Em resumo, as incertezas na origem celular da LLC ainda são motivos de muitos estudos. Os fenômenos que explicam sua gênese ainda não são conhecidos, mas provavelmente são relacionados a lesões genéticas que devem ser comuns aos dois subgrupos de LLC. O momento da transformação maligna também é incerto, mas acredita-se que as lesões genéticas e alterações cromossômicas leucemogênicas provavelmente ocorram em um estágio precoce na maturação dos linfócitos. Esta especulação se justifica no fato de que alterações na programação genética de uma célula imatura (pré-B) pode permitir a ativação de determinados fatores transcricionais específicos dos linfócitos T, o quê explicaria a expressão de proteínas de superfície e moléculas de sinalização comumente observada nestes linfócitos.

A heterogeneidade clínica entre os dois subgrupos da doença deve ser secundária a capacidade do clone maligno em responder aos sinais promotores oriundos do microambiente, que sustentam a célula transformada ou em

transformação. Pesquisadores têm procurado esclarecer os mecanismos de interação entre o estroma e a célula tumoral que regulam a sobrevivência das células neoplásicas na medula. As fortes evidências da influência das condições de cultura no comportamento celular sugerem que sistemas de cultura tridimensional podem prover melhor modelo para o que ocorre *in vivo* e deverá ajudar a elucidar os mecanismos de interação no microambiente, explicar a fisiopatogenia da doença e resultar em novos indicadores prognósticos e modalidades terapêuticas.

O propósito deste estudo é avaliar a reprodutibilidade do comportamento dos linfócitos leucêmicos *in vitro*, na presença de células do estroma de medula óssea no modelo bidimensional descrito por Burger et al. (1999) e avaliá-lo no sistema tridimensional de cultura.

2) OBJETIVOS

2.1) Geral

Avaliar a interação, ao longo do tempo, de linfócitos de Leucemia Linfocítica Crônica-B, com células de estroma de medula óssea normal em sistemas de cultura bi- e tri-dimensionais, correlacionando-a com variáveis clínicas.

2.2) Específicos

Estabelecer o método de co-cultura entre linfócitos da LLC e o estroma humano em estrutura tridimensional (esferóide).

Comparar a interação das células leucêmicas com o estroma de medula óssea nos modelos bi e tridimensionais de cultura.

Avaliar se existe diferença na capacidade de interação com o estroma em relação às variáveis clínicas, biológicas e individuais.

3) MATERIAL E MÉTODO

3.1) Pacientes

Participaram do estudo pacientes do HUCFF com leucemia linfocítica crônica, diagnosticada segundo critérios clínicos, morfológicos e fenotípicos da classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde. Foram excluídos os casos em tratamento ou em recaída pós-tratamento para evitar que alterações na biologia celular secundárias aos medicamentos fossem analisadas.

Para análise da influência de variáveis sobre a capacidade de migração para o estroma algumas informações foram coletadas dos prontuários médicos: sexo, idade no diagnóstico, idade na admissão no estudo, estagiamento clínico ao diagnóstico, estagiamento clínico na admissão no estudo, tempo de *follow-up* (tempo de acompanhamento entre o diagnóstico e a admissão no estudo), presença de progressão (mudança no estágio clínico do diagnóstico até a admissão no estudo), contagem de leucócitos na admissão no estudo e expressão do CD38. Infelizmente nossa instituição não possuía anticorpos para determinação da expressão do ZAP-70 por ocasião do início do estudo.

3.2) Amostras

Alíquotas do sangue periférico de aproximadamente 10ml foram colhidas em condições assépticas, com anticoagulante (20 U/ml de heparina de baixo peso molecular, Lique mine, Roche). Em alguns casos as mostras foram provenientes do laboratório de diagnóstico por imunofenotipagem em condições de coleta desconhecidas. As amostras foram manipuladas em um prazo máximo de 12h, quando mantidas em temperatura ambiente, ou em até 24h, quando mantidas resfriadas entre 4° e 8°C.

3.3) Separação e preparação das células mononucleadas

A fração de células mononucleares das amostras foi obtida por centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque Plus™ (Pharmacia Amersham). Após a centrifugação, as células foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*) e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com corante azul de Trypan. Estas células foram congeladas em solução crioprotetora contendo 40% de meio RPMI (Sigma Chemical Co.), 50% de soro fetal bovino (FCS, *fetal calf serum*) e 10% de dimetilsulfóxido para serem utilizadas no momento oportuno.

3.4) Citometria de fluxo

A expressão de moléculas de superfície foi determinada por citometria de fluxo. Resumidamente, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com os diferentes anticorpos (CD45, clone HI30, CD5, clone UCHT2, ambos da Becton Dickinson PharMacia, CD19, clone SJ25-C1 e CD38, clone HIT2, ambos da Caltag Lab.), diretamente conjugados com FITC, R-PE ou biotinilados, nas concentrações previamente estabelecidas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS contendo 3% de FCS e 0,01% de azida sódica e incubadas por 15 minutos a 4°C com estreptoavidina conjugada a PE-Cy7 (Caltag Lab.) para revelar os anticorpos biotinilados. A lise das hemácias foi feita utilizando a solução de lise da BD (Becton Dickinson) conforme as especificações do fabricante. A aquisição foi feita em citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson) com software Cell Quest 3.1.

3.5) Cultura de estroma de medula óssea

Para os experimentos de co-cultura, culturas de estroma de medula óssea humana foram estabelecidas a partir de amostras de doadores voluntários da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Serviço de Hematologia do HUCFF. As amostras foram submetidas à hemossedimentação com Hespan (hidroxietil de amido, McGaiy, Irvine, CA, USA) e distribuídas em garrafas de 25 cm² na concentração de 1 a 2 x 10⁶ / mL em meio Iscove's (Gibco Life Technologies) suplementado com 10% de FCS, 100 U/mL de penicilina sódica e 100 µg/mL de estreptomomicina. As culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ em atmosfera

úmida e o meio foi trocado periodicamente. Após duas a três semanas, as células não aderentes, no sobrenadante, foram retiradas e a monocamada de células aderentes foi lavada com PBS e mantida em estufa até atingir 70% de confluência. As células aderentes foram então submetidas à digestão enzimática com tripsina (0,125% de tripsina e 0,78 mM de EDTA) para posterior expansão.

3.6) Co-cultura de estroma de medula óssea e células leucêmicas

3.6.1) Análise da sobrevivência das células leucêmicas

Após serem descongeladas, aproximadamente 2×10^6 células mononucleares do sangue periférico foram distribuídas sobre monocamada de células de estroma de medula óssea humana ou sobre linhagem de estroma de medula óssea murina que sabidamente é capaz de sustentar a linfopoese B humana (ROSSI et al., 2003) em garrafas de 25 cm^2 , em meio Iscove's e α -Mem (Gibco), respectivamente, ambos suplementados com 10% de FCS. Para avaliação comparativa, o mesmo número de células mononucleares foi colocado em cultura apenas em meio Iscove's ou α -Mem suplementados com 10% de FCS. As culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO_2 em atmosfera úmida com trocas semanais do meio de cultura. Periodicamente, amostras das células no sobrenadante foram retiradas, quantificadas e a viabilidade foi determinada por azul de Trypan.

3.6.2) Co-cultura de células leucêmicas em monocamada ou esferóide de células de estroma de medula óssea.

As células de estroma foram distribuídas, 24-48h antes do experimento, em placas de quatro poços, na concentração de 3 a 5×10^5 células por cada poço e mantidas na estufa. Para estabelecer culturas tridimensionais do tipo esferóide, as células estromais foram cultivadas em placas de 96 poços com fundo em U previamente revestido com agarose a 1%. Foram distribuídas $2,5 \times 10^4$ células de estroma / poço e as placas foram mantidas na estufa por 3 a 4 dias para formação dos agregados celulares esferóides.

As células mononucleares foram descongeladas no dia do experimento e marcadas com 5-(e 6-)-carboxifluoresceína diacetato succinil éster (CFSE, Molecular Probes). Após três lavagens com PBS para remoção das proteínas do meio sobrenadante, as células foram ressuspensas em PBS com 0,1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) com 2 μM de CFSE em uma concentração que variou de 2 a 5 x 10⁶ células / mL e mantidas sob agitação constante por 10 minutos a 37°C, protegidas da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS suplementado com 10% de FCS para remoção do CFSE excedente.

3.6.3) Cinética de migração das células leucêmicas ao longo do tempo em culturas bi ou tridimensionais de estroma de medula óssea.

Cerca 2,5 a 5,0 x 10⁶ células mononucleares previamente marcadas com CFSE foram aplicadas sobre monocamadas de estroma enquanto cerca de 10⁶ células mononucleares foram distribuídas sobre esferóides de estroma de medula óssea. As co-culturas foram mantidas em estufa e, após dez minutos, meia hora, uma hora, duas horas, seis horas e doze horas, as células leucêmicas no meio sobrenadante e aderidas ao estroma foram retiradas e quantificadas por citometria de fluxo. Resumidamente, o sobrenadante foi retirado e a monocamada ou os esferóides foram lavados com PBS e submetidos à digestão enzimática com tripsina-EDTA. Para quantificação por citometria as células foram rigorosamente ressuspensas em volume fixo e a aquisição foi feita utilizando uma velocidade constante por um tempo determinado. O percentual de migração foi calculado considerando o número de eventos CFSE+ na região de linfócitos na fração de estroma em relação ao total aplicado na cultura. Para cada intervalo de tempo, foram realizadas duplicatas ou triplicatas. As médias dos valores de cada intervalo de tempo foram calculadas.

3.6.4) Migração das células leucêmicas em diferentes concentrações para o estroma de medula óssea em monocamada e em esferóide

Células mononucleares previamente marcados com CFSE foram aplicadas sobre culturas de estroma em monocamada e em esferóide em diferentes concentrações, que variaram de 1 a 100 x10⁵ nas co-culturas com monocamada e

de 0,5 a 20×10^5 nas co-culturas com esferóide. No momento do pico de migração previamente estabelecido para cada amostra, as células leucêmicas foram quantificadas por citometria como descrito anteriormente. O percentual de células mononucleares do sangue periférico aderidas ao estroma foi calculado em relação ao total de células contadas (sobrenadante mais aderidas). Para cada concentração celular o experimento foi realizado em duplicata ou triplicata. As médias dos valores de cada concentração foram comparadas.

3.7) Análise Estatística

Os resultados das migrações são expressos como percentual de células encontradas no estroma em relação ao total de linfócitos leucêmicos contados na cultura. A média dos valores máximos de migração para cada amostra foi calculada. Foi utilizada a mediana das idades e do número de leucócitos para divisão dos casos em duas categorias, maiores ou menores que a mediana.

Para a avaliação da relação entre as diversas variáveis e a capacidade de migração utilizou-se o teste *Chi-square*. Foram considerados como estatisticamente significativos o valores de *p* inferiores a 0,05 pelo método exato de Fisher.

Para análise estatística foi utilizado o software SPSS 13.0 versão para windows (setembro, 2004).

4) RESULTADOS

4.1) Característica dos Pacientes

Participaram do estudo 18 pacientes com diagnóstico de LLC. Onze pacientes são do sexo masculino e sete do sexo feminino o que resulta em uma proporção M:F de 1,6:1. A mediana das idades ao diagnóstico e no início do estudo foi de 70 anos (43 a 83 anos e 45 a 83 anos, respectivamente). Esta distribuição de sexo e idade é semelhante à descrita nos levantamentos epidemiológicos (SEER, 2007).

As amostras de sangue para separação das células mononucleares foram colhidas por ocasião do diagnóstico em 12 casos enquanto 6 amostras foram obtidas de pacientes virgens de tratamento em consultas de follow-up do HUCFF e de consultórios particulares. O tempo médio de evolução destes 6 casos foi 42 meses (24 a 108 meses) e 4 casos já apresentavam progressão da doença (evolução do estágio clínico) neste intervalo. Baseado nas informações dos prontuários, 8 pacientes foram estagiados como Binet A, 7 casos como Binet B e 3 casos como Binet C ao iniciarem o estudo.

Todos os casos tiveram os diagnósticos confirmados de acordo com o imunofenótipo (Figura 2) e apresentavam dois ou mais pontos no sistema de score para o diagnóstico da LLC. A tabela 4 apresenta com detalhes as informações de cada caso.

Tabela 4. Características dos casos do estudo.

Casos	Sexo	Idade ^a	Estágio Clínico ^b	Leucócitos ^c	Tempo de follow-up ^d	Fenótipo das Células B CD5 ⁺	CD38
1	M	78	B (A)	24900	24	CD19 ⁺ CD23 ⁺	CD22 ⁻ 42%
2	F	80	A	28500	*	CD19 ⁺ CD23 ⁺	CD22 ⁻ CD79b ⁺ 9%
3	M	66	A	26600	*	CD19 ⁺ CD79b ⁻	CD23 ⁺ 19%
4	F	80	C	32400	*	CD19 ⁺ CD79b ⁻	CD23 ⁺ 9%
5	F	56	A	15000	*	CD19 ⁺ CD79b ⁻	CD23 ⁺ 29%
6	M	83	A	23900	*	CD19 ⁺ CD23 ⁺	CD22 ⁻ CD79b ⁺ 21%
7	F	81	B (B)	16700	24	CD20 ⁺ CD23 ⁺	CD22 ⁺ CD79b ⁻ 48%
8	M	68	A	26000	*	CD19 ⁺	CD23 ⁺ 27%
9	M	74	B (A)	47200	24	CD19 ⁺ CD79b ⁻	CD23 ⁺ 38%
10	F	72	C (B)	19800	108	CD19 ⁺	CD23 ⁺ -
11	M	63	A	29200	*	CD19 ⁺ CD79b ⁻	CD23 ⁺ 11%
12	M	47	C (A)	40000	48	CD19 ⁺ CD23 ⁺	CD22 ⁺ CD79b ⁻ -
13	F	81	A	36200	*	CD19 ⁺	CD23 ⁺ -
14	F	58	A	22700	*	CD19 ⁺	CD23 ⁺ 14%
15	M	55	B	10300	*	CD20 ⁺ CD79b ⁻	CD23 ⁺ -
16	M	71	B	140000	*	CD20 ⁺ CD23 ⁺	CD22 ⁺ CD79b ⁻ -
17	M	50	B	52600	*	CD22 ⁺ CD79b ⁻	CD23 ⁺ 62%
18	M	45	B (B)	64400	24	CD20 ⁺ CD23 ⁺	CD22 ⁺ CD79b ⁻ 36%

^a idade na admissão no estudo^b estágio clínico de Binet na admissão no estudo, entre parênteses o estágio clínico no diagnóstico.^c em células por microlitro de sangue periférico, na admissão no estudo.^d tempo em meses.

* casos cuja a admissão no estudo foi no mesmo momento do diagnóstico, sem tempo de follow-up.

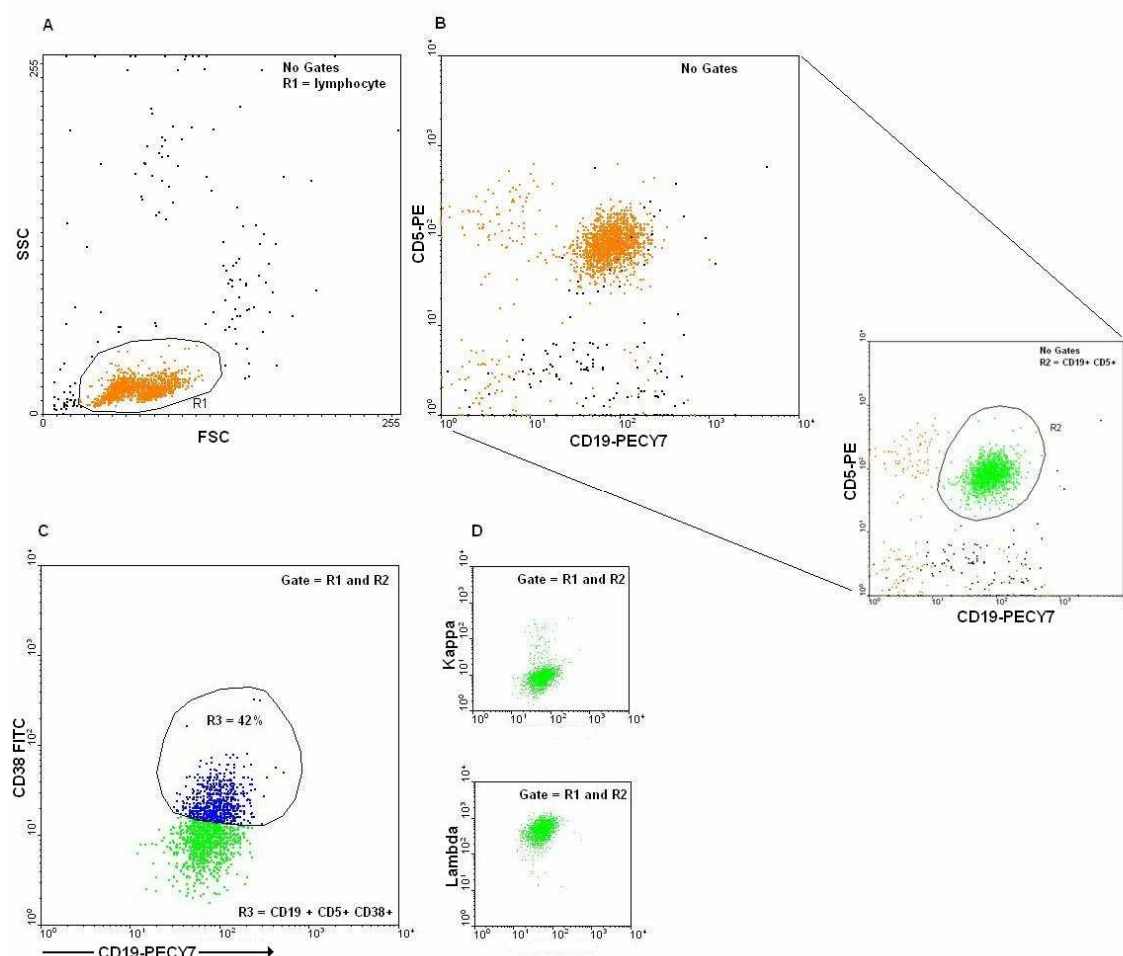


Figura 2. Caracterização fenotípica das células leucêmicas no sangue periférico. O perfil da amostra 1 mostra monoclonalidade lambda (D, parte inferior) e 42% dos linfócitos CD19+ e CD5 + são CD38+(C).

4.2) Avaliação da sobrevida dos linfócitos leucêmicos *in vitro*

Para verificar a função protetora do estroma de medula óssea, uma das amostras foi cultivada em quatro situações diferentes: com estroma de medula óssea humana em meio Iscove's, com estroma de medula óssea murina em meio α -Mem e apenas com meio de cultura Iscove's e α -Mem. Verificou-se, independentemente da situação de cultura, que somente entre 40 e 75% das células era viável nas primeiras 24h (Figura 3). Nos dias subsequentes, o estroma de medula óssea humano foi capaz de manter a viabilidade celular por até 5 dias. No

último dia de cultura, 63% das células leucêmicas estavam vivas no estroma humano, 40% no estroma murino, 27% em meio Iscove's e 19% em meio α -MEM.

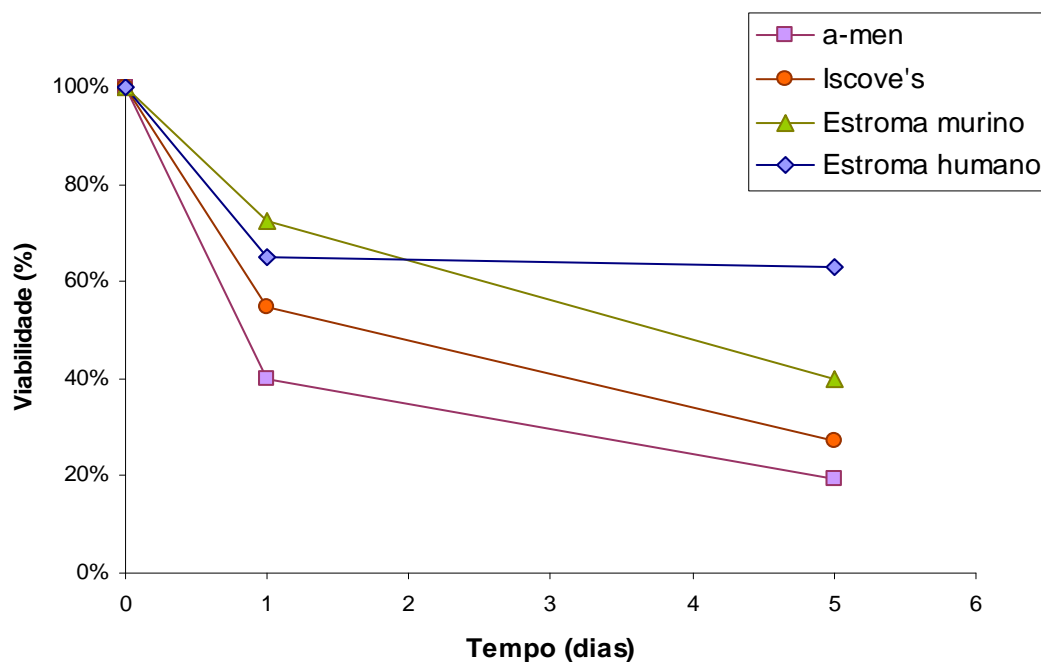


Figura 3. Gráfico da viabilidade das células leucêmicas em cultura ao longo do tempo. As células mononucleadas do sangue periférico de paciente com LLC-B foram distribuídas em garrafas de cultura na presença ou não de estroma de medula óssea humana ou de linhagem de estroma de medula óssea murina. A intervalos de tempo alíquotas das células no sobrenadante foram retiradas, quantificadas e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com Azul de Tripan.

Verificou-se, ainda, que, como descrito anteriormente (BURGER et al., 1999), as células leucêmicas migraram por entre as células de estroma de medula óssea (Figura 4), formando ninhos semelhantes à *cobble stones*.

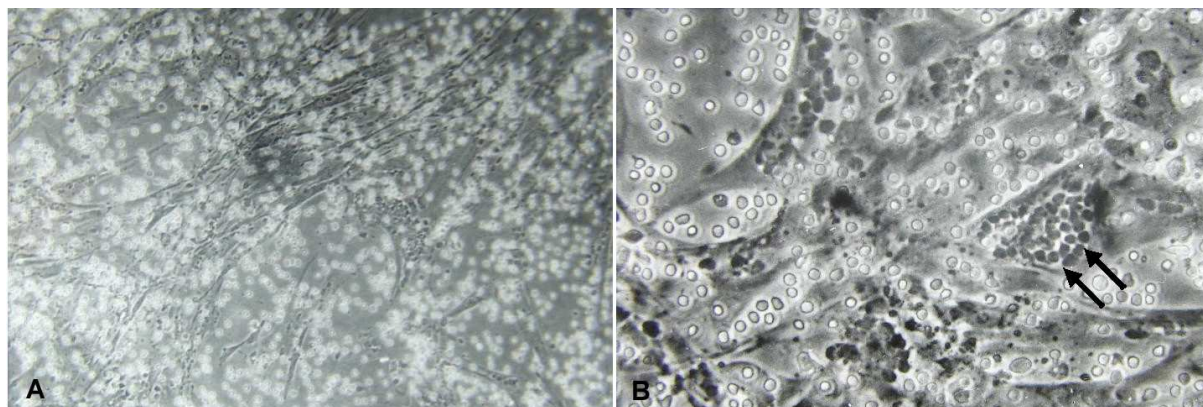


Figura 4. Fotomicrografia da co-cultura de células leucêmicas com células de estroma de medula óssea humana. (A) As células leucêmicas (pequenas, arredondadas e refringentes) encontram-se dispersas sobre a monocamada de células do estroma. Microscopia de contraste de fase. Aumento original 100X. (B) Detalhe da co-cultura mostrando interação íntima e migração das células leucêmicas que formam ninhos (setas) por entre as células de estroma da medula óssea. Microscopia de contraste de fase. Aumento original 320X.

4.3) Cinética de migração de células leucêmicas ao longo do tempo em cultura bidimensional de células de estroma de medula óssea

Uma vez que se verificou que o estroma de medula óssea humana era capaz de manter as células leucêmicas e que estas migravam ativamente por entre as células estromais, a cinética de migração das LLC foi avaliada em relação ao tempo de co-cultura e à concentração celular nos modelos bi e tridimensional, monocamada e esferóide respectivamente.

Foram avaliados quatorze casos nos experimentos de migração em monocamada em diferentes intervalos de tempo. Para tanto as células leucêmicas previamente marcadas com CFSE foram distribuídas sobre a cultura em monocamada de células de estroma e, a intervalos de tempo, foram retiradas do sobrenadante enquanto a monocamada foi lavada e tripsinizada para análise por citometria de fluxo. Os eventos CFSE+ foram facilmente identificados e apresentavam distribuição, quanto ao tamanho (FSC) e complexidade (SSC) de pequenos linfócitos (Figura 5).

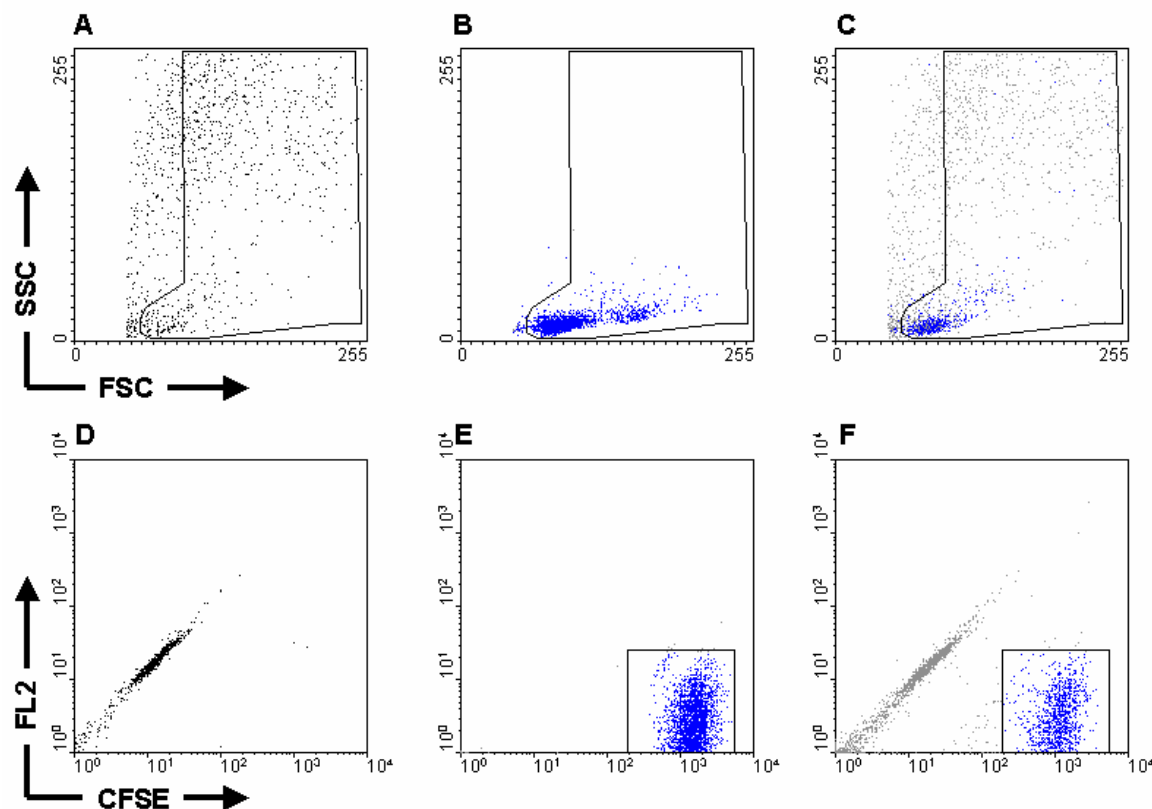


Figura 5. Citometria de fluxo das células leucêmicas marcadas com CFSE e de células de estroma de medula óssea em co-cultura. As células leucêmicas foram previamente marcadas com CFSE e co-cultivadas com monocamada de estroma de medula óssea humana normal. O percentual de migração foi determinado calculando-se o número de eventos CFSE+ na monocamada em relação ao total de eventos CFSE+ num determinado tempo de aquisição. Distribuição por tamanho e complexidade das células de estroma (A), das células leucêmicas (B) e da co-cultura (C). Células leucêmicas, CFSE+, (E, em azul) são distinguíveis das células de estroma nas co-culturas (F) e estão ausentes no controle da monocamada de estroma (D).

Surpreendentemente, observou-se que as células leucêmicas provenientes de diferentes amostras apresentaram uma cinética de migração própria (Tabela 5 e Figura 6). Em 4 casos somente cerca de 1% das células leucêmicas se encontravam associadas à monocamada a cada intervalo de tempo. As demais amostras apresentaram um percentual de migração máximo variável (5 a 50%), com pico variando entre 30 e 60 minutos de co-cultura (Figura 6A e 6B). A média dos valores máximos de migração foi 11,6% (1,1% a 49,1%).

A análise da figura 6 indica que as amostras capazes de migrar apresentaram, basicamente, três padrões de migração: estabelecimento de um pico de migração após 30 (Figura 6A) ou 60 minutos (Figura 6B) de co-cultura e uma

progressiva, embora pequena, migração ao longo do tempo sem que se observasse um pico até 120 minutos (Figura 6C).

Tabela 5. Cinética de migração das amostras de LLC em monocamada de estroma de medula óssea humana conforme diferentes intervalos de tempo.

Amostras	Percentual de migração em cada intervalo de tempo				
	10'	30'	60'	120'	300'
1	0,4%	1,0%	1,4%	1,9%	a
2	5,0%	10,6%	4,6%	5,9%	5,1%
3	0,7%	5,2%	1,1%	1,0%	1,5%
6	1,4%	6,8%	7,4%	10,2%	a
7	1,7%	9,9%	1,4%	1,8%	1,2%
8	23,6%	4,6%	49,1%	23,2%	3,5%
9	0,6%	1,1%	0,8%	0,4%	0,7%
10	0,2%	0,7%	1,7%	2,8%	a
12	1,1%	2,9%	2,5%	3,1%	a
13	0,5%	1,1%	2,2%	3,9%	a
14	3,6%	12,1%	11,1%	6,8%	10,9%
16	0,3%	0,5%	0,9%	0,9%	1,4%
17	14,4%	16,6%	34,4%	5,2%	9,8%
18	7,8%	5,3%	16,5%	17,7%	8,2%

^a não estudado

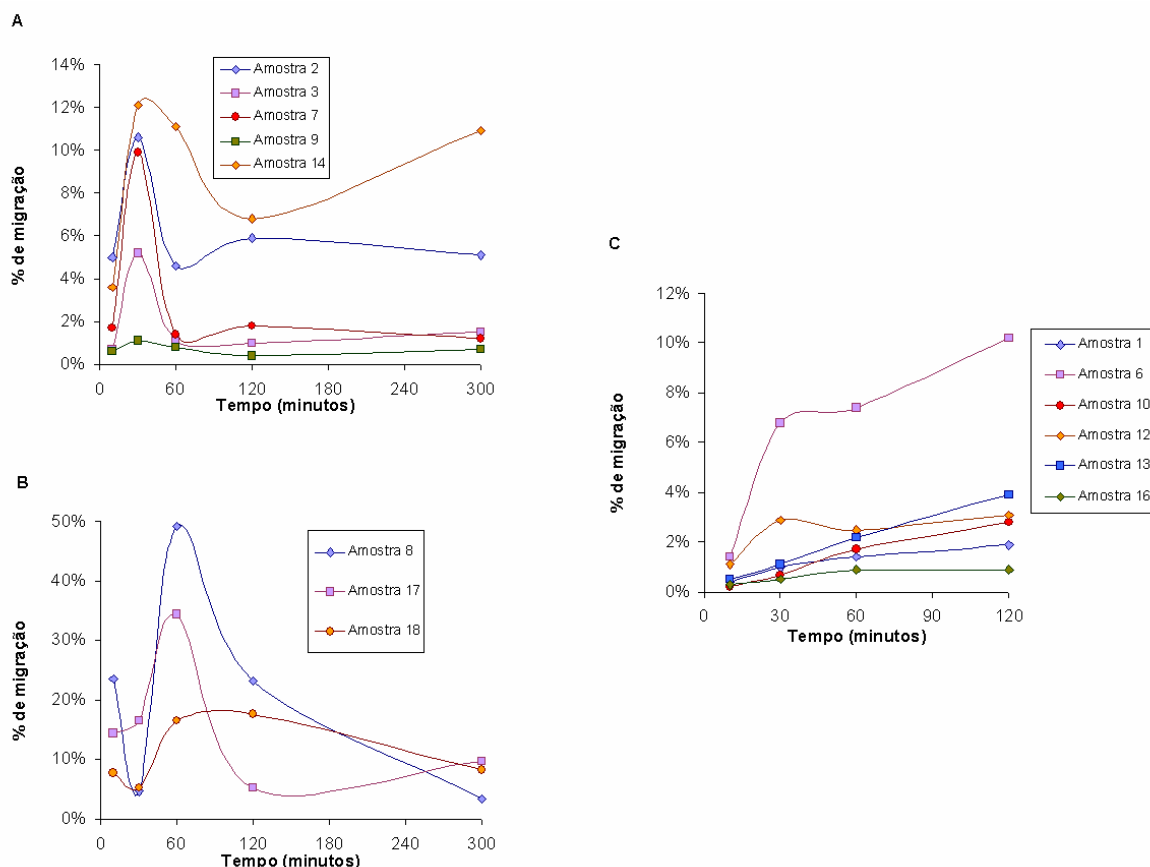


Figura 6. Gráficos das migrações das células leucêmicas em monocamada de células de estroma de medula óssea em relação ao tempo. Observamos três padrões de migração. Pico de migração em 30 minutos (A), pico de migração em 60 minutos (B), aumento lentamente progressivo da migração ao longo do tempo (C).

Com o propósito de avaliar se o comportamento *in vitro* tem correlação com a apresentação clínica da doença algumas variáveis foram analisadas em relação à capacidade de migração no estroma. Apesar do pequeno número de casos e de variáveis disponíveis, segregando os casos com migração acima e abaixo da média dos valores máximos de migração, não observamos diferenças quanto ao sexo, estágio da doença, o tempo médio de evolução, a presença de progressão, o número de leucócitos do sangue periférico na admissão no estudo ou expressão de CD38, mas a idade esteve diferentemente distribuídos nestes dois grupos (Tabela 6).

Avaliando as idades dos pacientes em relação à taxa de migração, observamos que nenhum caso com idade acima da mediana teve índice máximo de migração acima da média dos valores máximos de migração, enquanto 67% dos casos com idade abaixo da mediana das idades tiveram migração acima da média

(Tabela 7). Isto sugere que os pacientes mais jovens apresentam maior potencial de interação da célula leucêmica com o estroma (Figura 7).

Tabela 6. Distribuição dos casos conforme algumas variáveis e o percentual migrado em monocamada.

Variáveis	Migração acima de 11,6%	Migração abaixo de 11,6%	<i>p</i>
Sexo			
M (9)	33% (3)	67% (6)	0,54
F (5)	20% (1)	80% (4)	
Idade			
>70 (8)	- (0)	100% (8)	0,015
≤70 (6)	67% (4)	33% (2)	
Estágio			
A + B (12)	33% (4)	67% (8)	0,49
C (2)	- (0)	100% (2)	
Tempo de follow-up			
Não (8)	37,5%(3)	62,5%(5)	0,40
Sim (6)	16,7%(1)	83,3%(5)	
(Tempo médio de <i>follow-up</i> [#])	(24 meses)	(45,6 meses)	
Progressão			
Sim (4)	0% (0)	100% (4)	0,33
Não (2)	50% (1)	50% (1)	
Leucócitos*			
<27550 (7)	- (0)	100% (2)	0,45
>27550 (7)	50% (2)	50% (2)	
CD38 ^a			
≥30% (5)	40% (2)	60% (3)	0,73
<30% (5)	40% (2)	60% (3)	

Entre parênteses o número absoluto de casos;

[#] apenas entre os casos com tempo de evolução;

* mediana dos números de leucócitos no sangue periférico nas admissões no estudo;

^a quatro amostras não possuíam a informação.

Tabela 7. Correlação entre o potencial de migração na monocamada de estroma de medula óssea e idade média dos pacientes.

Casos	Nº de casos	Migração média	Idade Mediana
Acima de 70 anos com migração acima da média ^b	0	_a	_a
Acima de 70 anos com migração abaixo da média	8	5,2%	81
Abaixo ou igual a 70 anos com migração abaixo da média	2	4,27%	66
Abaixo ou igual a 70 anos com migração acima da média	4	28,3%	54

^a sem amostra para análise

^b a média dos valores máximos de migração de cada amostra foi 11,6%

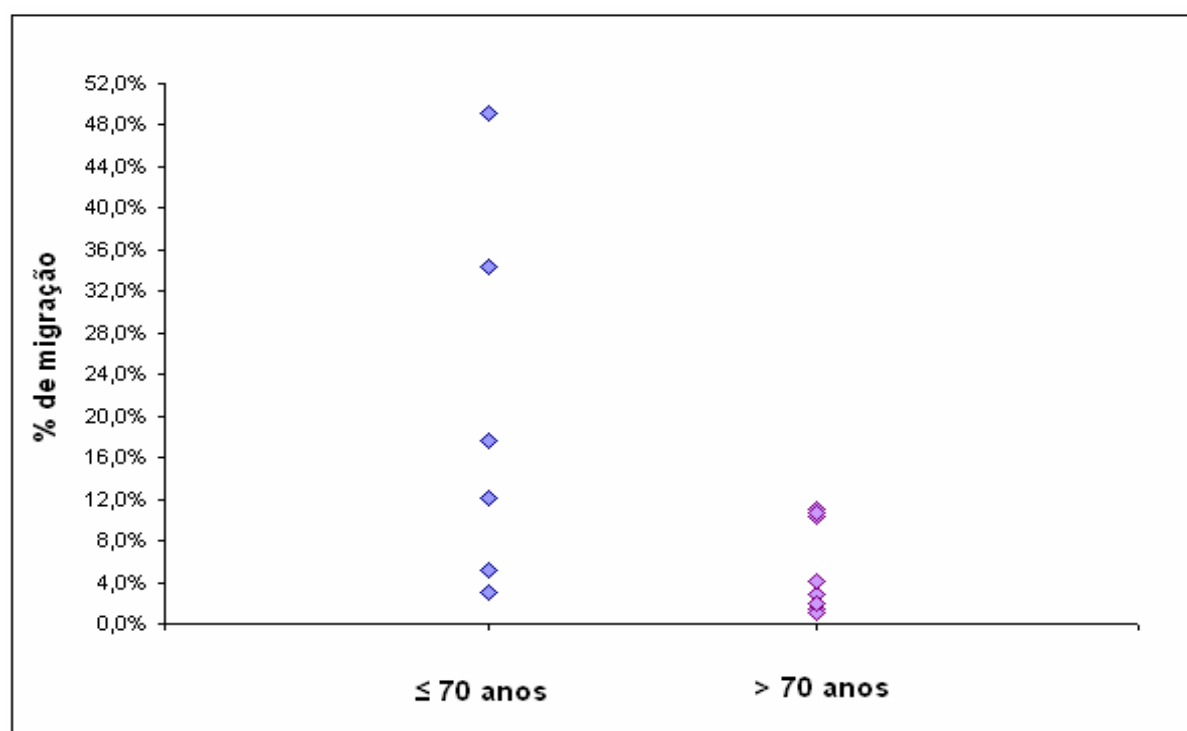


Figura 7. Correlação entre a capacidade de migrar em monocamada de células de estroma de medula óssea e a idade dos pacientes. Cada ponto representa um caso. A distribuição do percentual de migração em relação à categorização das idades conforme a mediana mostra que pacientes mais novos apresentam picos de migração superior.

Analisando a presença de progressão e o tempo médio de *follow-up* dos casos, observamos que apenas os casos com migração abaixo da média dos valores máximos de migração apresentaram progressão do estágio clínico e estes apresentavam 45,6 meses de evolução contra 24 meses do grupo com migração acima da média. Estes resultados, apesar de não apresentarem significância estatística, sugerem que os casos mais avançados ou com maior tempo de evolução possuem menor capacidade de migrar.

4.4) Cinética de migração de células leucêmicas ao longo do tempo em sistema tridimensional (esferóide) de cultura de estroma de medula óssea.

Uma vez que a migração em monocamada de células aderidas a uma superfície plástica não é representativa da migração transmedular que as células devem efetuar no processo de colonização do microambiente da medula óssea, culturas tridimensionais do tipo esférico de células de estroma de medula óssea humana foram desenvolvidos no laboratório e a capacidade das células leucêmicas de migrar nestes agregados celulares foi testada.

Foi demonstrado anteriormente, que as células de estroma de medula óssea humana são capazes de formar agregados celulares arredondados (Figura 8A e C), cujo diâmetro é dependente do número de células (ROSSI et al., 2005). As análises microscópicas e ultraestruturais realizadas mostraram que no interior do esférico as células são poliédricas enquanto que na camada mais externa elas são fusiformes (Figura 8B). Além disto, as células apresentaram inúmeros prolongamentos, formando uma rede tridimensional (Figura 8D-F). Verificou-se, comparando-se as células cultivadas em monocamada e em 3D, modificações na organização do citoesqueleto (Figura 8G-I). Em ambas as situações as células expressam α -actina de músculo liso, mas em monocamada houve a formação de fibras de estresse (Figura 8G), não observadas em 3D (Figura 8I). Em ambos os casos, as células secretaram fibronectina, mas nos esféricos esta formava uma ampla rede (Figura 8H e J).

Quatro amostras foram testadas no sistema tridimensional de cultura, três delas foram as que apresentaram maior taxa de migração em monocamada. O índice de migração apresentado foi significativamente inferior ao índice encontrado

pelas mesmas amostras na migração em monocamada com exceção da amostra 12 que já havia migrado pouco no sistema de monocamada.

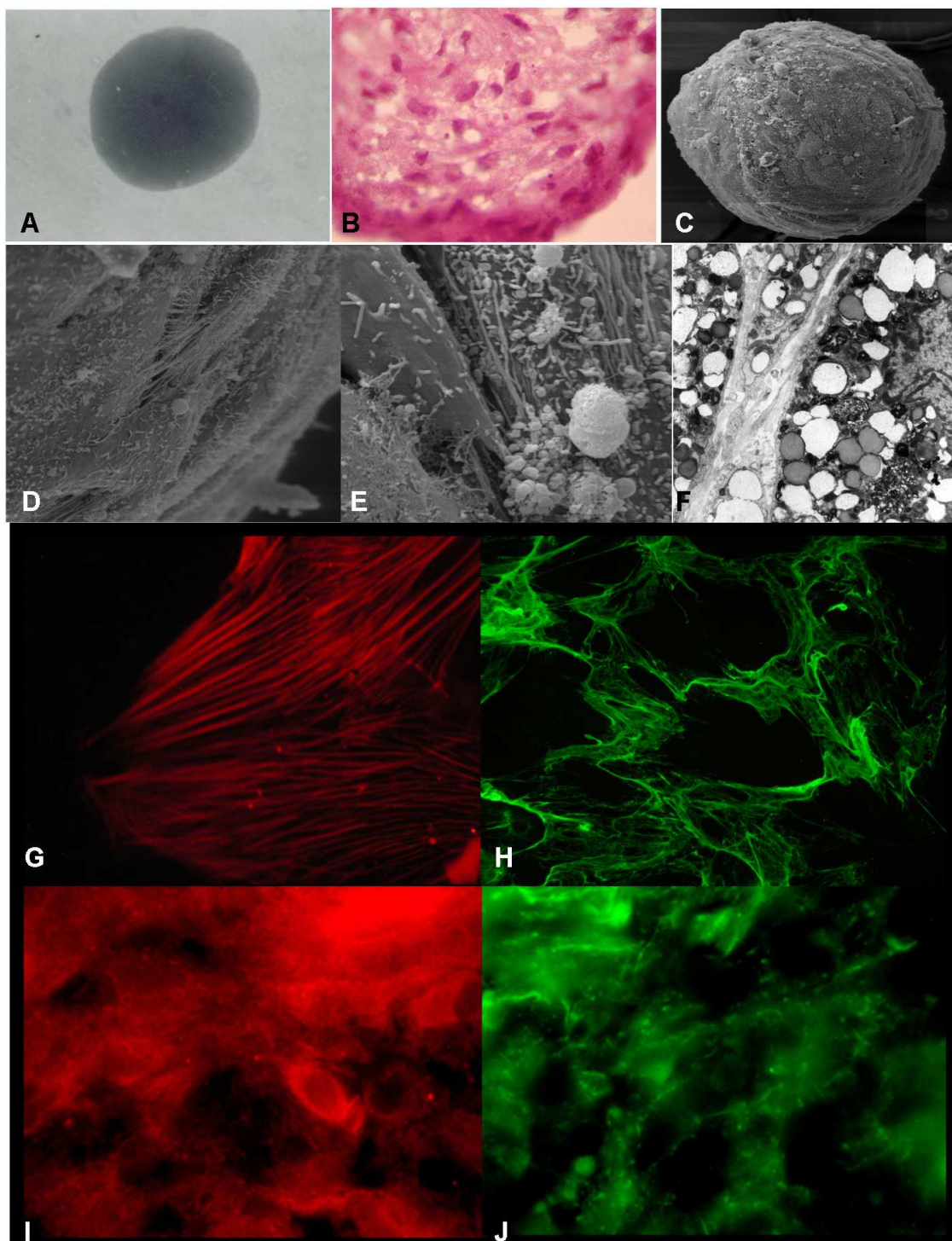


Figura 8. Morfologia dos esferóides de células de estroma de medula óssea humana. (A) Microscopia de contraste de fase. Microscópio invertido. (Aumento original 100X). (B) Aspecto microscópico dos esferóides. (H-E; aumento original 400X). (C-E) Microscopia eletrônica de varredura. Células na superfície mostram-se achatadas com inúmeras projeções. (Aumento original 280X, 2000X e 5000X, respectivamente). (F) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando espaços intercelulares. (Aumento original

16000X). (G-J) As células de estroma de medula óssea foram cultivadas por 10 dias em monocamada (G-H) ou em esferóide (I-J) e incubadas com anticorpo específico para α -actina de músculo liso (G e I) ou fibronectina (H e J) e analisadas em microscópio de fluorescência. (Aumento original 1000X). (Fonte: Barros, APDN et al., 2004. 3rd International Symposium on Extracellular Matrix. Angra dos Reis, RJ. Almeida, LDB et al., 2005).

Assim como nas co-culturas em monocamada, as amostras apresentaram uma cinética de migração própria sem um padrão comum de migração apesar das poucas amostras estudadas neste modelo. Novamente, observamos três comportamentos, um pico de migração em 120 minutos (Amostra 8), um pico mais precoce aos 30 minutos média dos valores máximos de migração (Amostra 12) e uma migração quase constante, com pequena tendência de elevação ao longo do tempo, mas sem formação de um pico (Amostras 17 e 18). Estes resultados diferem daqueles encontrados pelas mesmas amostras no sistema bidimensional, pois naquele modelo as mesmas amostras apresentaram, respectivamente, um pico de migração em momento diferente (Amostra 8), um aumento progressivo, sem formação de pico (Amostra 12) e, finalmente, as amostras que em 3D migraram de forma linear, na monocamada apresentaram pico de migração (Amostra 17 e 18). A média dos valores máximos de migração no esferóide foi 1,82%, a maior migração foi 3,1% e a menor foi 0,7%. A Tabela 8 e a Figura 9 mostram os resultados enquanto a Figura 10 ilustra um corte histológico de uma das co-culturas.

Tabela 8. Cinética de migração das amostras de LLC em esferóides de estroma de medula óssea humana conforme diferentes intervalos de tempo.

Amostras	Percentual de migração em cada intervalo de tempo				
	10'	30'	60'	120'	300'
8	a	1,44%	a	3,14%	0,95%
12	1,56%	2,77%	1,60%	1,60%	a
17	a	0,23%	0,61%	0,54%	0,70%
18	a	0,75%	0,64%	0,60%	1,15%

^a não estudado

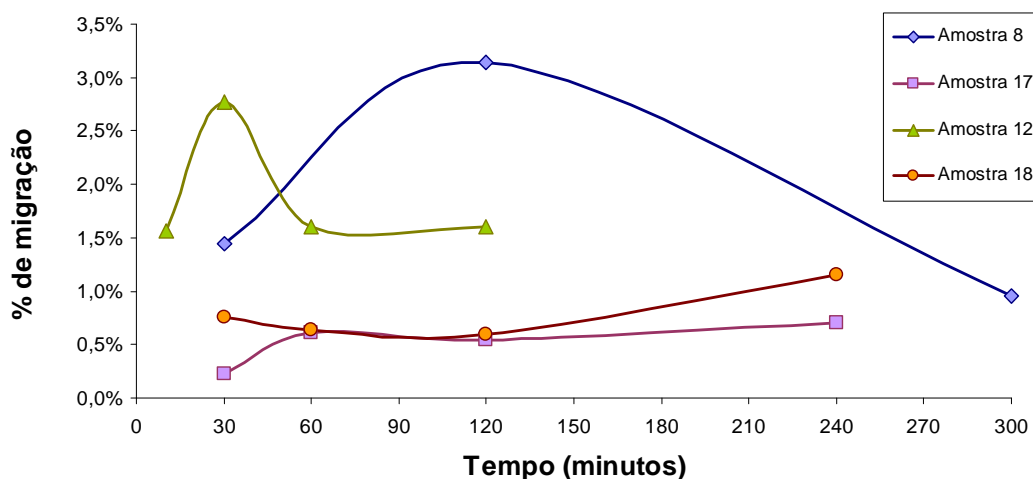


Figura 9. Gráfico das migrações das células leucêmicas em esferóide de células de estroma de medula óssea em relação ao tempo. Observe o pico em 30 minutos da amostra 12, o pico em 120 minutos da amostra 8 e a gradual elevação no percentual migrado das amostras 17 e 18. Os pequenos percentuais na escala do eixo vertical demonstram que raras células foram capazes de migrar no microtecido.

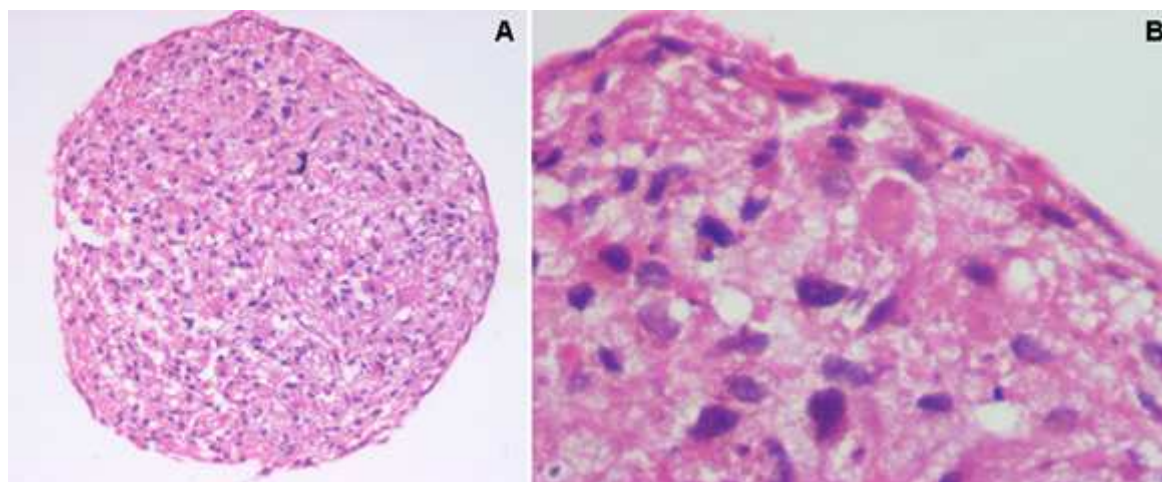


Figura 10. Aspecto morfológico de esferóide de células de estroma de medula óssea humana co-cultivado com células de LLC-B. As células de estroma de medula óssea formaram agregados celulares tridimensionais do tipo esferóide, mas as células leucêmicas não são identificadas. (A) H-E. Aumento original 100X. (B) H-E. Aumento original 400X. Nota-se que no interior do esferóide as células são poliédricas enquanto que na camada mais externa elas são fusiformes.

4.5) Migração de células leucêmicas em sistema bidimensional (monocamada) de cultura de células de medula óssea conforme diferentes concentrações aplicadas

Três casos, cujos perfis de migração eram conhecidos, foram avaliados nos experimentos de migração em monocamada, aonde diferentes concentrações de células leucêmicas foram co-cultivadas com o estroma. Verificou-se uma variação no percentual de migração em função da concentração celular aplicada sobre a monocamada em duas das três amostras testadas enquanto a terceira amostra migrou muito pouco e com pequenas variações nas diferentes concentrações celulares. A tabela 9 demonstra os valores encontrados.

Tabela 9. Valores da migração em monocamada conforme diferentes concentrações celulares.

Amostras	Concentração celular aplicada ($\times 10^5$ /poço)				
	1	5	10	50	100
2	4,98%	0,30%	1,11%	-	-
7	1,87%	0,73%	1,22%	-	-
18	1,71%	1,90%	0,94%	1,39%	5,07%

- não estudado

A amostra 18 apresentou valores de migração muito próximos nas menores concentrações: 1,71% com 1×10^5 cél./poço; 1,9% com 5×10^5 cél./poço, 0,94% com 10×10^5 cél./poço e 1,39% com 50×10^5 cél./poço, e uma elevação súbita para 5,07% na maior concentração (100×10^5). A amostra 2 apresentou migração de 4,98% das células aplicada na menor concentração, 0,3% na concentração intermediária e 1,11% na maior concentração. Este perfil curiosamente demonstra uma relação invertida na qual a maior migração esteve relacionada com a menor concentração celular. Por fim, a amostra 7 também apresentou uma relação invertida entre concentração celular e migração. Houve um máximo de migração de 1,87% das células aplicadas na menor concentração, um mínimo de 0,73% na concentração intermediária e 1,22% na maior concentração. Observamos que a

variabilidade desta amostra foi muito pequena de forma que não podemos atribuir um pico de migração, mas sim considerar que ocorreu uma migração constante independente da concentração celular aplicada. A figura 11 ilustra o comportamento das três amostras.

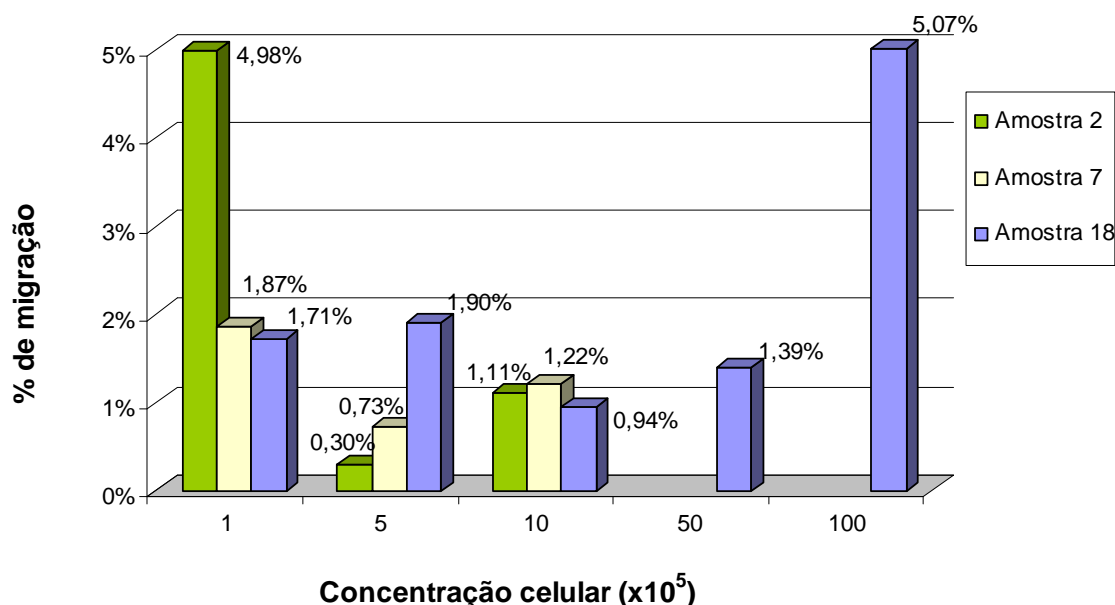


Figura 11. Gráfico da migração de células leucêmicas em monocamada de células de estroma de medula óssea em relação à concentração celular. Observe o máximo migrado com as amostras 2 e 18, respectivamente na menor concentração e na maior concentração, enquanto a amostra 7 não apresentou diferenças. Note, que o percentual migrado é muito pequeno.

4.6) Migração de células leucêmicas em sistema tridimensional (esferóide) de cultura de células de medula óssea conforme diferentes concentrações aplicadas

Duas amostras foram testadas quanto à capacidade de migração em esferóide, dependente da concentração celular. Verificamos que, ao contrário do observado em monocamada, em nenhum dos dois casos analisados houve um pico de migração em função da concentração celular aplicada (Tabela 10 e Figura 12). Curiosamente, a amostra 8 apresentou um percentual de migração muito acima do verificado anteriormente neste sistema. Havíamos observado que neste caso específico, a camada celular mais externa dos esferóides não se apresentava

fusiformes, o que conferia um aspecto frouxo aos mesmos (não mostrado) que pode ter favorecido a migração.

Tabela 10. Valores da migração em esferóide conforme diferentes concentrações celulares

Amostras	Concentração celular aplicada ($\times 10^5$ /poço)				
	0,5	1	5	10	20
8	15,2%	21,7%	19,2%	24,2%	22,5%
18	3,7%	5,8%	4,2%	1,9%	5,8%

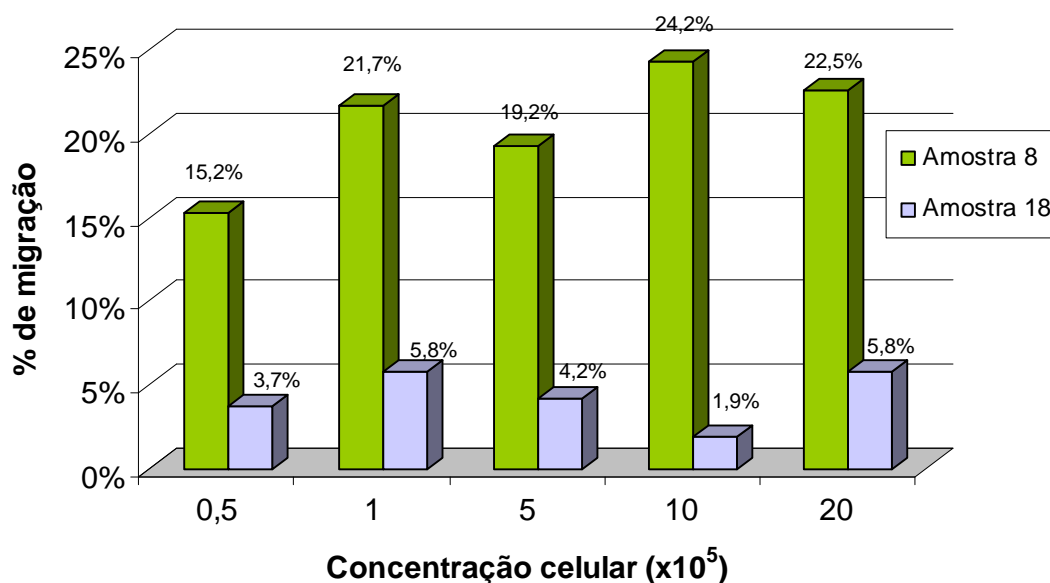


Figura 12. Gráfico da migração de células leucêmicas em esferóides de células de estroma de medula óssea em relação à concentração celular. Observe que não há grandes variações do percentual sugerindo que um percentual constante de células tenha capacidade para migrar. A amostra 18 apresentou valores de migração muito pequenos, enquanto a amostra 8 apresentou valores elevados secundário à alteração no esferóide.

5) DISCUSSÃO

A sobrevivência das células leucêmicas na LLC-B parece depender de sua interação com o estroma da medula óssea, que as protege do efeito dos quimioterápicos (PANAYIOTIDIS et al., 1996). Uma vez que esta interação entre células leucêmicas e estroma medular é importante na biologia das leucemias, levantou-se a hipótese de que a capacidade de migrar por entre células de estroma *in vitro* poderia estar ligada à agressividade e progressão da leucemia. Este estudo procurou investigar a migração dos linfócitos leucêmicos na monocamada de células do estroma de medula óssea, comparando-a com a migração em modelo de cultura tridimensional, que mimetiza com melhor fidelidade a organização estrutural encontrada *in vivo*. Com este novo método, intencionávamos avaliar se o comportamento dos linfócitos leucêmicos no sistema tridimensional difere do comportamento encontrado na cultura bidimensional, o que pode refletir diferentes mecanismos de interação a serem explorados em novos estudos.

Inicialmente, confirmamos o papel protetor das células do estroma de medula óssea ao observar que a taxa de morte celular *in vitro* é menor na presença delas. Após 5 dias em cultura 63% das células leucêmicas estavam vivas no estroma humano, 40% no estroma murino, 27% em meio Iscove's e somente 19% em meio α -men. Além disto, tanto no estroma murino, quanto no humano, as células de LLC-B migraram por entre as células do estroma. Estes resultados confirmam estudos anteriores que demonstraram o papel protetor do estroma de medula óssea (CALIGARIS-CAPPIO, 2003; LAGNEAUX et al., 1998).

A seguir, investigamos a cinética de migração das células de LLC-B derivadas do sangue periférico na monocamada de estroma de medula óssea humana, ao longo do tempo. Obtivemos resultados que diferem daqueles descritos anteriormente (BURGER et al., 1999). Observamos que os linfócitos leucêmicos migraram para o estroma em intervalos de tempo e quantidade que variaram de amostra para amostra. Em 64% das amostras testadas (9 casos) houve um padrão de migração unimodal: após um máximo de migração ocorreu um decréscimo no percentual de migração. Os 36% restantes (5 casos) apresentaram um padrão de ascensão gradual no percentual de migração ao longo do tempo, apesar deste percentual ser discreto.

Burger et al. (1999), em seus estudos de co-cultura de linfócitos leucêmicos com estroma murino, descreveram este último perfil de migração, no qual quanto maior o intervalo de tempo de interação, maior o número de células leucêmicas aderidas ao estroma. O padrão unimodal que encontramos na maioria das nossas amostras não confere com os dados de Burger (1999). Contudo, este padrão nos possibilita especular, já que não verificamos morte celular, em variação no número total de células, que alguns dos linfócitos leucêmicos que migraram para o estroma, após um período de interação, se soltam do estroma e retornam ao sobrenadante. Este modelo coincide com o descrito em co-culturas com progenitores linfóides B, aonde uma interação dinâmica foi observada e *in vivo*, no qual os linfócitos leucêmicos migram para a medula óssea ou órgãos linfóides, estabelecem contato com células acessórias, recebem estímulo proliferativo e anti-apoptótico e voltam a circular na corrente sanguínea (STEVENSON & CALIGARIS-CAPPIO, 2004).

A análise da influência de algumas variáveis clínicas (leucometria, estágio da doença e progressão prévia), biológica (expressão do CD38) e individual (sexo e idade) demonstrou que apenas a idade esteve diferentemente distribuída quando separamos os casos que migraram com índice acima e abaixo da média das migrações máximas.

A distribuição das variáveis tempo médio de evolução e presença de progressão parecem estar diferentemente distribuídas em entre os dois grupos, mas como o número de amostras com estas informações foi pequeno, a possibilidade de erro é considerável e nova análise com maior amostra é necessária. Contudo, os resultados encontrados parecem refletir uma tendência a uma menor migração nos casos com maior tempo de evolução (tempo médio de evolução de 45,6 meses para os casos abaixo da média e 24 meses para os casos acima da média) ou presença de progressão (100% dos casos com progressão tiveram migração abaixo da média).

Estes achados são surpreendentes visto que em doenças em estágios tardios, portanto provavelmente mais agressivas, os linfócitos leucêmicos apresentam maior potencial de transitar entre os tecidos onde sofrem mais divisões e a participação do estroma nesta proliferação leucêmica neste processo é crucial (STEVENSON & CALIGARIS-CAPPIO, 2004). Tal fato pode conduzir a hipótese de que nas doenças mais agressivas, como observado em outras doenças onco-hematológicas (KUEHL & BERGSAGEL, 2002), os linfócitos leucêmicos se tornem

independentes do contato com o estroma. Contudo, no caso específico de LLC-B, a literatura descreve que a capacidade dos linfócitos de sobreviver *in vitro* é diminuída (COLLINS et al., 1989). Acreditamos que a interpretação correta para os dados encontrados é que os casos com maior tempo de *follow-up* são os mesmos que apresentam progressão, e que eles provavelmente representam casos com evolução indolente, com baixa taxa proliferativa e progressão lenta e que possuem sobrevida prolongada uma vez que ainda não requereram tratamento até o momento do ingresso no estudo.

A idade dos pacientes ao ingressarem no estudo também esteve diferentemente distribuída entre os grupos com pico de migração acima ou abaixo da média. Os casos mais jovens apresentaram taxas de migração mais elevadas. Corroborando com a suspeita acima, acreditamos que os pacientes mais idosos são aqueles com doença mais antiga e com maior probabilidade de progressão devido ao longo tempo de doença, enquanto os pacientes mais jovens representam os casos recém diagnosticados, dentre os quais alguns serão agressivos e outros indolentes. No entanto, a influência do envelhecimento sobre as células leucêmicas podem justificar os achados e uma avaliação com outros estudos é necessária.

In vivo, as células leucêmicas migram para a medula óssea, onde se localizam em nichos específicos (VEGA et al., 2002). Pode-se imaginar que esta migração compreenda as etapas descritas (NILSSON et al., 2006), ou seja, migração transendotelial, migração transmedular e fixação no nicho. Os mecanismos envolvidos na migração transmedular são menos conhecidos, mas as células migrariam em contato com um *continuum* tridimensional formado pelas células do estroma da medula óssea, que não é reproduzido no sistema de cultura bidimensional. Assim, investigamos se a capacidade de migração das células leucêmicas na monocamada e num modelo tridimensional de cultura de células de estroma de medula seria comparável.

Comparando os resultados obtidos nos dois sistemas de co-cultura, observamos que o perfil e o percentual de migração eram diferentes, ressaltando que somente um pequeno percentual das células leucêmicas foi capaz de migrar no modelo 3D (Figura 9). Este resultado pode estar associado ao fato dos esferóides de células estromais formarem uma estrutura mais densa e compacta que a monocamada, exigindo mecanismos adicionais para penetração que selecionaria uma subpopulação de linfócitos leucêmicos. Por outro lado, levantamos a hipótese

de saturação do sistema em função do número de células leucêmicas adicionado a cada esferóide. Para testar esta hipótese, diferentes concentrações de células leucêmicas foram distribuídas para cada esferóide e o percentual de migração foi determinado num momento específico. Verificou-se, nas duas amostras testadas, que somente um percentual das células foi capaz de migrar nos esferóides, independentemente da concentração celular (Figura 12). O mesmo não foi observado nas culturas bidimensionais, aonde uma variação no percentual de migração ocorreu dependendo da concentração celular (Figura 11). Estes resultados apontam para existência de uma subpopulação de linfócitos leucêmicos apta a migrar num sistema tridimensional. Esta hipótese está em acordo com a recente proposta de existência de uma subpopulação de células leucêmicas, que tem sido denominada de célula-tronco leucêmica (LSC, *Leukemic Stem Cells*), responsável pela manutenção das leucemias (HUNTLY & GILLILAND, 2005; PARDAL et al., 2003; PASSEGUÉ et al., 2003). Considerando este conceito e levando em conta que as células utilizadas neste modelo são derivadas do sangue periférico, pode-se imaginar que apenas uma pequena população celular do sangue periférico seja capaz de migrar para a medula óssea, aonde se localizaria recirculando periodicamente e mantendo a leucemia.

Neste estudo, devido ao pequeno número de amostras e às poucas variáveis disponíveis, não foi possível determinar se o comportamento *in vitro* refletiria a apresentação clínica da doença. Maior amostra para análise multivariada, com a inclusão de mais variáveis tais como a expressão do ZAP-70 e o status mutacional da IgV_H são fundamentais para correlacionar o comportamento *in vitro* e *in vivo*. Mesmo assim, os dados encontrados apontam para a possibilidade de que os casos mais indolentes tenham menor capacidade de migrar para o estroma e, consequentemente, nos permite especular que os casos mais agressivos consigam interagir mais com o estroma de medula óssea. Isto confirma a importância do estroma de medula óssea na patogênese da doença. Além disto, é a primeira vez que a capacidade de células de LLC-B de migrar em um sistema tridimensional foi estudada e os resultados preliminares sugerem que este modelo pode ser utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na migração transmedular que somente uma subpopulação celular apresentou.

6) CONCLUSÃO

Este estudo é o primeiro a avaliar a interação dos linfócitos leucêmicos da LLC com células do estroma de medula óssea humana organizadas em um sistema tridimensional. Também avaliamos, concomitantemente, o comportamento dos linfócitos leucêmicos em sistemas bidimensionais. Nossos resultados no modelo bidimensional são conflitantes com os resultados descritos em estudo anterior (BURGER et al., 1999) e diferem também dos resultados que encontramos no modelo 3D. Provavelmente, este estudo é mais um a constatar que o comportamento celular nos modelos 2D e 3D são distintos.

Nossas análises indicam que apenas uma subpopulação de linfócitos leucêmicos apresenta capacidade de migrar para o estroma de medula óssea. Baseado no conhecimento atual, a capacidade de migrar demonstrada *in vitro* provavelmente é secundária à necessidade da célula em interagir com outro elemento celular em busca de estímulos para sobrevivência. A taxa de migração encontrada depende do tamanho desta subpopulação “ávida” pelo estroma e o tamanho desta subpopulação deve ser diretamente proporcional à taxa proliferativa desta doença, ou seja, à agressividade.

Nossos resultados contribuem para esta hipótese. Com os poucos dados que temos descrevemos que as leucemias dos pacientes mais jovens interagiram mais com o estroma e encontramos uma tendência dos casos supostamente indolentes (com maior tempo de *follow-up*, alguns já com progressão do estágio clínico, mas que não requereram tratamento até o momento do estudo) em migrarem menos. Esta análise é baseada nos experimentos em monocamada, infelizmente não tivemos número suficiente de experimentos em sistema 3D para fazer levantamento semelhante.

Independentemente do tamanho desta subpopulação, se apenas um percentual de células leucêmicas apresenta capacidade para migrarem, as células que constituem este grupo devem possuir características biológicas distintas das células sem capacidade para migrar tais como moléculas de adesão, receptores de quimiocinas, vias de sinalização e outros. Conhecer estas diferenças biológicas será fundamental para o entendimento da patogênese da doença e pesquisa de possíveis alvos terapêuticos.

Estes mecanismos poderão ser analisados *in vitro* pelos sistemas de co-cultura com o estroma de medula óssea e com outras células acessórias à LLC. Um dos primeiros passos para esta investigação será comparar a subpopulação que migra com a subpopulação que não migra e para isso a técnica de co-cultura com o estroma de medula torna-se uma forma de segregar estas subpopulações.

Acrescer a este método novas técnicas como a cultura tridimensional, a presença de outras células acessórias e um invólucro endotelial no esferóide transformará este microambiente *in vitro* mais próximo daquele encontrado *in vivo* e mais fidedignas serão as descobertas.

7) BIBLIOGRAFIA

1. ABILEZ, O., BENHARASH, P., MEHROTRA, M., MIYAMOTO, E., GALE, A., PICQUET, J., XU, C., ZARINS, C. A novel culture system shows that stem cells can be grown in 3D and under physiologic pulsatile conditions for tissue engineering of vascular grafts. *J Surg Res.*, v.132, p.170-178, 2006.

2. ALMEIDA, L.D.B., BARROS, A.P.D.N., BAPTISTA, L.S., BOROJEVIC, R., SPECTOR, N., ROSSI, M.I.D. A capacidade de migrar em modelo tridimensional de cultura de células de estroma de medula óssea é específica de uma subpopulação de leucemia linfocítica crônica (LLC-B). Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia. Rio de Janeiro, RJ. Novembro, 2005. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 27 (Sup.), p.129, 2005.

3. BARROS, A.P.D.N. Desenvolvimento de culturas tridimensionais multicelulares para o estudo das interações celulares no microambiente hematopoético. Tese de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ. p. 33, 2007.

4. BLEUL, C.C., FUHLBRIGGE, R.C., CASASNOVAS, J.M., AIUTI, A., SPRINGER, T.A. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.*, v.184, p.1101-1109, 1996.

5. BOUDREAU, N.J., JONES, P.L. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. *Biochem. J.*, v.339, p.481-488, 1999.

6. BURGER, J.A., BURGER, M., KIPPS, T.J. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, v.94, p.3658-3667, 1999

7. BURGER, J.A., TSUKADA, N., BURGER, M., ZVAIFLER, N.J., DELL'AQUILA, M., KIPPS, T.J. Blood-derived nurse-like cells protect chronic

lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, v.96, p.2655-2663, 2000.

8. BURKLE, A., NIEDERMEIER, M., SCHMITT-GRAFF, A., WIERDA, W.G., KEATING, M.J., BURGER, J.A. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v.110, P.3316-3325, 2007.

9. BUSCHLE, M., CAMPANA, D., CARDING, S.R., RICHARD, C., HOFFBRAND, A.V., BRENNER, M.K. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.*, v.177, p.213-218, 1993.

10. CALIGARIS-CAPPIO, F., HAMBLIN, T.J. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol.*, v.17, p.399-408, 1999.

11. CALIGARIS-CAPPIO F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.*, v.123, p.380-388, 2003.

12. CANCER FACTS & FIGURES 2006. AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <<http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2006PWSecured.pdf>>. Acesso em 25 set. 2007.

13. CANCER FACTS & FIGURES 2007. AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <<http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2007PWSecured.pdf>>. Acesso em 25 set. 2007

14. CHAOUCHI, N., WALLON, C., GOJJARD, C., TERTIAN, G., RUDENT, A., CAPUT, D., FERRERA, P., MINTY, A., VAZQUEZ, A., DELFRAISSY, J.F. Interleukin-13 inhibits interleukin-2-induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from in vitro apoptosis. *Blood*, v.87, p.1022-1029, 1996.

15. CHEN, A., APGAR, J., HUYNH, L., DICKER, F., GIAGO-MCGAHAN, T., RASSENTI, L., WEISS, A., KIPPS, T.J. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v.105, p.2036-2041, 2005.

16. CHESON, B.D., BENNETT, J.M., GREVER, M., KAY, N., KEATING, M.J., O'BRIEN, S., RAI, K.R. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, v.87, p.4990-4997, 1996.

17. CHIORAZZI, N., FERRARINI, M. B cell chronic Lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.*, v.21, p.841-894, 2003.

18. CHUNSONG, H., YULLING, H., LI, W., JIE, X., GANG, Z., QIUPING, Z., KEJIAN, Z., LI Q. CHANG, A.E., YOUXIN, J., JINQUAN, T. CXC chemokine ligand 13 and CC chemokine ligand 19 cooperatively render resistance to apoptosis in B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia CD23+CD5+ B cells. *J Immunol.*, v.177, p.6713-6722, 2006.

19. COLLINS, R.J., VERSCHUER, L.A., HARMON, B.V., PRENTICE, R.L., POPE, J.H., KERR, J.F. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol.*, v.71, p.343-350, 1989.

20. CRESPO, M., BOSCH, F., VILLAMOR, N., BELLOSILLO, B., COLOMER, D., ROZMAN, M., MARCE, S., LOPEZ-GUILLERMO, A., CAMPO, E., MONTSERRAT, E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, v.348, p.1764-1775, 2003.

21. DAMLE, R.N., WASIL T., FAIS, F., GHIOTTO F., VALETTO A., ALLEN, S.L., BUCHBINDER, A., BUDMAN, D., DITTMAR, K., KOLITZ, J., et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.*, v.94, p. 1840-1847, 1999.

22. DAMLE, R.N., GHIOTTO, F., VALETTO, A., ALBESIANO, E., FAIS, F., YAN, X.J., SISON, C.P., ALLEN, S.L., KOLITZ, J., SCHULMAN, P. et al. B-cell

chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*, v.99, p.4087-4093, 2002.

23. DAMLE, R.N., BATLIWALLA, F.M., GHIOTTO, F., VALETTO, A., ALBESIANO, E., SISON, C., ALLEN, S.L., KOLITZ, J., VINCIGUERRA, V.P., KUDALKAR, P. et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood*, v.104, p.375-382, 2004.

24. DANCESCU, M., RUBIO-TRUJILLO, M., BIRON, G., BRON, D., DELESSESSE, G., SAFARTI, M. Interleukin-4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and up regulates Bcl-2 expression. *J Exp Med.*, v.176, p.1319-1326, 1992.

25. DEAGLIO, S., CAPOBIANCO, A., BERGUI, L., DURIG, J., MORABITO, F., DUHRSEN, U., MALAVI, F. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.*, v.102, p.2146-2155, 2003.

26. DI CELLE, P.F., CARBONE, A., MARCHIS, D., ZHOU, D., SOZZANI, S., ZUPO, S., PINI, M., MANTOVANI, A., FOA, R. Cytokine gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of constitutive interleukin-8 (IL-8) mRNA expression and secretion of biologically active IL-8 protein. *Blood.*, v.84, p.220-228, 1994.

27. DIEHL, L.F., KARNELL, L.H., MENCK, H.R. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base Report on Age, Gender, Treatment, and Outcomes of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer*, v.86, p.2684-2692, 1999.

28. DIGHIERO, G., BINET, J.L. When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.*, v.343, p. 1799-1801, 2000.

29. DIGHIERO, G. CLL Biology and Prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, p.278-284, 2005

30. DÖEHNER, H., STILGENBAUER, S., BENNER, A., LEUPOLT, E., KRÖBER, A., BULLINGER, L., DÖHNER, K., BENTZ, M., LICHTER, P. Genomic aberrations and survival in chronic Lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.*, v.343, p.1910-1916, 2000.
31. DORSHKIND, K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol.*, v.8, p.111-137, 1990.
32. FAIS, F., GHIOTTO, F., HASHIMOTO, S., SELLARS, B., VALETTO, A., ALLEN, S.L., SCHULMAN, P., VINCIGUERRA, V.P., RAI, K., RASSENTI, L.Z., et al. Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Express Restricted Sets of Mutated and Unmutated Antigen Receptors. *J Clin Invest.*, v.102, p.1515-1525, 1998.
33. FALCÃO, R.P. Proliferação monoclonal B CD5+ subclínica. *Rev. Bras. Hematol Hemoter.*, v.25, p.267-271, 2005.
34. FENG, Z., TATEISHI, Y., NOMURA, Y., KITAJIMA, T., NAKMURA, T. Construction of fibroblast-collagen gels with orientated fibrils induced by static or dynamic stress: toward the fabrication of small tendon grafts. *J Artif Organs*, v.9, p.220-225, 2006.
35. FRANCA DI CELLE, P., MARIANI, S., RIERA, L., STACCHINI, A., REATO, G., FOA, R. Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood*, v.87, p.4382-4389, 1996.
36. FRANKEL, A., BUCKMAN, R., KERBEL, R.S. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.*, v.57, p.2388-2393, 1997.
37. GHIA, P., CALIGARIS-CAPPIO, F. The Origin and Nature of the Chronic Lymphocytic Leukemia Lymphocyte. In: CHESON, B.D. Chronic Lymphoid Leukemias. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. Cap. 4, p. 63-80.

38. GHIA, P., STROLA, G., GRANZIERO, L., GEUNA, M., GUIDA, G., SALLUSTO, F., RUFFING, N., MONTAGNA, L., PICCOLI, P., CHILOSI, M., et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol.*, v.32, p.1403-1413, 2002.

39. GHIA, P., GUIDA, G., STELLA, S., GOTTARDI, D., GEUNA, M., STROLA, G., SCIELZO, C., CALIGARIS-CAPPIO, F. et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*, v.101, p.1262-1269, 2003.

40. GOLDIN, L.R., PFEIFFER, R.M., LI, X., HEMMINKI, K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-cancer Database. *Blood*, v.104, p.1850-1854, 2004.

41. GRANZIERO, L., GHIA P., CIRCOSTA, P., GOTTARDI, D., STROLA, G., GEUNA, M., MONTAGNA, L., PICCOLI, P., CHILOSI, M., CALIGARIS-CAPPIO, F. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v.97, p.2777-2783, 2001.

42. HAMBLIN, T. Historical Aspects of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Br J Haematol.*, v.111, p.1023-1034, 2000.

43. HAMBLIN, T.J., OSCIER, D.G. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. *Blood Rev.*, v.11, p.119-128, 1997.

44. HAMBLIN, T.J., DAVIS, Z., GARDINER, A., OSCIER, D.G., STEVENSON F.K. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.*, v.94, p.1848-1854, 1999.

45. HAMBLIN, T.J., ORCHAND, J.A., IBBOTSON, R.E., DAVIS, Z., THOMAS, P.W., STEVENSON, F.K., OSCIER, D.G. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic

lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood.*, v.99, p.1023-1029, 2002.

46. HAN, T., BARCOS, M., EMRICH, L., OZER, H., GAJERA, R., GOMEZ, G.A., REESE, P.A., MINOWADA, J., BLOOM, M.L., SADAMORI, N., et al. Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data. *J Clin Oncol.*, v.2, p.562-570, 1984.

47. HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., DIEBOLD, J., FLANDRIN, G., MULLER-HERMELINK, H.K., VARDIMAN, J., LISTER, T.A., BLOOMFIELD, C.D. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting - Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.*, v.17, p.3835-3849, 1999.

48. HENRIQUE, R., ACHTEN, R., MAES, B., VERHOEF, G., DE WOLF-PEETERS, C. Guidelines for subtyping small B-cell lymphomas in bone marrow biopsies. *Virchows Arch.*, v.435, p.549-558, 1999.

49. HOFFBRAND, A.V., PANAYIOTIDIS, P., REITTIE, J., GANESHAGURU, K. Autocrine and paracrine growth loops in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol.*, v.30, p.306-317, 1993.

50. HUANG, C.Y., REUBEN, P.M., D'IPPOLITO, G., SCHILLER, P.C., CHEUNG, H.S. Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.*, v.278, p.428-436, 2004.

51. HUNTLY, B.J., GILLILAND, D.G. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat. Rev. Cancer*, v.5, p.311-21, 2005.

52. ISHIBE, N., SGAMBATI, M.T., FONTAINE, L., GOLDIN, L.R., JAIN, N., WEISSMAN, N., MARTI, G.E., CAPORASO, N.E. Clinical characteristics of familial

B-CLL in the National Cancer Institute Familial Registry. *Leuk Lymphoma*, v.42, p.99-108, 2001.

53. JACOBSEN, K., OSMOND, D.G. Microenvironmental organization and stromal cell associations of B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow. *Eur J Immunol.*, v.20, p.2395-2404, 1990.

54. JEWELL, A.P., WORMAN, C.P., LYDYARD, P.M., YONG, K.L., GILES, F.J., GOLDSTONE, A.H. Interferon-alpha up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL cells from apoptosis in vitro and in vivo. *Br J Haematol.*, v.88, p.268-274, 1994.

55. JONES, D., BENJAMIN, R.J., SHAHSAFAEI, A., DORFMAN, D.M. The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v.95, p.627-632, 2000.

56. JOHNSTON, J.B. *Chronic Lymphocytic Leukemia*. In: LEE RG, FOERSTER J, LUKENS J, PARASKEVAS F, GREER JP, RODGERS GM. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. Cap. 93, p.2405-2427.

57. JURLANDER, J. The cellular biology of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol. Hematol.*, v. 27, p.29-52, 1998.

58. KEATING, M.J. *Chronic Lymphocytic Leukemia*. In: HENDERSON ES, LISTER TA, GREAVES MF. *Leukemia*. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2002. Cap. 28, p. 656-691.

59. KEATING, M.J., CHIORAZZI, N., MESSMER, B., DAMLE, R.N., ALLEN, S.L., RAI, K.R., FERRARINI, M., KIPPS, T.J. Biology and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, p.153-175, 2003.

60. KERN, C., CORNUEL, J.F., BILLARD, C., TANG, R., ROUILLARD, D., STENOUE, V., DEFRANCE, T., AJCHENBAUM-CYMBALISTA, F., SIMONIN, P.Y., FELDBLUM, S., et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood*, v.103, p.679-688, 2004.

61. KIERNEY, P.C., DORSHKIND, K. B lymphocyte precursors and myeloid progenitors survive in diffusion chamber cultures but B cell differentiation requires close association with stromal cells. *Blood*, v.70, p.1418-1424, 1987.

62. KIPPS, T.J. *Chronic Lymphocytic Leukemia and Related Disease*. In: BEUTLER, E., LICHTMAN, M.A., COLLIER, B.S., KIPPS, T.J., SELIGSOHN, U. *Williams Hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. Cap. 98, p. 1137-1140.

63. KLEIN, U., TU, Y., STOLOVITZKY, G.A., MATTIOLI, M., CATTORETTI, G., HUSSON, H., FREEDMAN, A., INGHIRAMI, G., CRO, L., BALDINI, L., et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med.*, v.194, p.1625-1638, 2001.

64. KLUNDER, I., HÜLSER, D.F. Beta-galactosidase activity in transfected Ltk-cells is differentially regulated in monolayer and in spheroid cultures. *Exp Cell Res.*, v.207, p.155-62, 1993.

65. KUEHL, W.M., BERGSAGEL, P.L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer*, v.2, p.175-87, 2002.

66. KULMBURG, P., RADKE, M., DIGEL, W. Lymphotoxin-alpha is an autocrine growth factor for chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia.*, v.12, p.493-498, 1998.

67. KUMAR, C.C. Signaling by integrin receptors. *Oncogene*, v.17, p.1365-1373, 1998.

68. KUNZ-SHUGHART, L.A., KREUTZ, M., KNUECHEL, R. Multicellular spheroids: a three-dimensional *in vitro* culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol.*, v.79, p.1-23, 1998.

69. KUNZ-SHUGHART, L.A. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and *in vivo* tumor. *Cell Biol Int.*, v.23, p.157-161, 1999.

70. LAGNEAUX, L., DELFORGE, A., BRON, D., DE BRUYN, C., STRYCKMANS, P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*, v.91, p.2387-2396, 1998.

71. LAGNEAUX, L., DELFORGE, A., MASSY, M., BERNIER, M., BRON, D. Increased production of SDF-1 by bone marrow (BM) stromal cells (SC) derived from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients in comparison with normal subjects: role in the migration of CLL B cells. *Blood*, v.96, p.362a, 2000.

72. LAMBERT, C.A., COLIGE, A.C., MUNAUT, C., LAPIÈRE, C.M., NUSGENS, B.V. Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biol.*, v.20, p.397-408, 2001.

73. LANHAM, S., HAMBLIN, T., OSCIER, D., IBBOTSON, R., STEVENSON, F., PACKHAM, G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v.101, p.1087-1093, 2003.

74. LEBIEN, T.W., BERTRAND, F.E. *Lymphocyte Ontogeny*. In: BEUTLER, E., LICHTMAN, M.A., COLLIER, B.S., KIPPS, T.J., SELIGSOHN, U. *Williams Hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. Cap. 82, p. 927-957.

75. LÓPEZ-GIRAL, S., QUINTANA, N.E., CABRERIZO, M., ALFONSO-PÉREZ, M., SALA-VALDÉS, M., DE SORIA, V.G., FERNÁNDEZ-RAÑADA, J.M., FERNÁNDEZ-RUIZ, E., MUÑOZ, C. et al. Chemokine receptors that mediate B cell

homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol.*, v.76, p.462-471, 2004.

76. MA, Q., JONES, D. SPRINGER, T.A. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity.*, v.10, p.463-471, 1999.

77. MAINOU-FOWLER, T., CRAIG, V.A., COPPLESTONE, J.A., HAMON, M.D., PRENTICE, A.G. Interleukin-5 (IL-5) increases spontaneous apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro independently of bcl-2 expression and is inhibited by IL-4. *Blood*, v.84, p.2297-304, 1994.

78. MARTI, G.E., RAWSTRON, A.C., GHIA, P., HILLMEN, P., HOULSTON, R.S., KAY, N., SCHLEINITZ, T.A., CAPORASO, N. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.*, v.130, p.325-332, 2005.

79. MAUNEY, J.R., SJOSTORM, S., BLUMBERG, J., HORAN, R., O'LEARY, J.P., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., VOLLOCH, V., KAPLAN, D.L. Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Calcif Tissue Int.*, v.74, p.458-468, 2004.

80. MELCHERS, F., ROLINK, A., GRAWUNDER, U., WINKLER, T.H., KARASUYAMA, H., GHIA, P., ANDERSSON, J. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol.*, v.7, p.214-227, 1995.

81. MESSMER, B.T., MESSMER, D., ALLEN, S.L., KOLITZ, J.E., KUDALKAR, P., CESAR, D., MURPHY, E.J., KODURU, P., FERRARINI, M., ZUPO, S., et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.*, v.115, p.755-764, 2005.

82. MOHLE, R., FAILENSCHMID, C., BAUTZ, F., KANZ, L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated

with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia*, v.13, p.1954-1959, 1999.

83. MONTSERRAT, E. New prognostic markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, p.279-84, 2006

84. MUELLER-KLIESER, W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol.*, v.273, p.C1109-C1123, 1997.

85. NAGASAWA, T., HIROTA, S., TACHIBANA, K., TAKAKURA, N., NISHIKAWA, S., KITAMURA, Y., YOSHIDA, N., KIKUTANI, H., KISHIMOTO, T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, v.382, p. 635-638, 1996.

86. NAGASAWA, T., KITAMURA, Y., KISHIMOTO, T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growthstimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA.*, Washington, v.91, n.6, p.2305-2309, Mar. 1994.

87. NILSSON, S.K., DEBATIS, M.E., DOONER, M.S., MADRI, J.A., QUESENBERRY, P.J., BECKER, P.S. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J Histochem Cytochem.*, v.46, p.371-377, 1998.

88. NILSSON, S.K., JOHNSTON, H.M., COVERDALE, J.A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*, v.97, p. 2293-2299, 2001.

89. NILSSON, S.K., SIMMONS, P.J., BERTONCELLO, I. Hemopoietic stem cell engraftment. *Exp. Hematol.*, v.34, p.123-129, 2006.

90. OCIER, D., FEGAN, C., HILLMEN, P., ILLIDGE, T., JONHSON, S., MAGUIRE, P., MATUTES, E., MILLIGAN, D. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.*, v.125, p.294-317, 2004.

91. OPPEZZO, P., VUILLIER, F., VASCONCELOS, Y., DUMAS, G., MAGNAC, C., PAYELLE-BROGARD, B., PRITSCH, O., DIGHIRO, G. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood*. v.101, p.4029-4032, 2003.

92. OSMOND, D.G., RICO-VARGAS, S., VALENZONA, H., FAUTEUX, L., LIU, L., JANANI, R., LU, L., JACOBSEN, K. Apoptosis and macrophage-mediated cell deletion in the regulation of B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Immunol. Rev.*, v.142, p.209-230, 1994.

93. OVERALL, C.M, LÓPEZ-OTÍN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, v.2, p.657-672, 2002.

94. PANAYIOTIDIS, P., GANESHAGURU, K., JABBAR, S.A., HOFFBRAND, A.V. Alpha-interferon (α -INF) protects B-chronic lymphocytic leukaemia cells from apoptotic cell death in vitro. *Br J Haematol.*, v.86, p.169-173, 1993.

95. PANAYIOTIDIS, P., GANESHAGURU, K., JABBAR, S.A., HOFFBRAND, A.V. Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol.*, v.85, p.439-445, 1994.

96. PANAYIOTIDIS, P., JONES, D., GANESHAGURU, K., FORONI, L., HOFFBRAND, A.V. Human bone marrow stromal cell prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cell in vivo. *Br J Haematol.*, v.92, p.97-103, 1996.

97. PANGALIS, G.A., ROUSSOU, P.A., KITTAS, C., MITSOULIS-MENTZIKOFF, C., MATSOUKA-ALEXANDRIDIS, P., ANAGNOSTOPOULOS, N., ROMBOS, I., FESSAS, P. Patterns of bone marrow involvement in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic (well differentiated) non-Hodgkin's lymphoma. Its clinical significance in relation to their differential diagnosis and prognosis. *Cancer*, Atlanta, v.54, p.702-708, 1984.

98. PARDAL, R., CLARKE, M.F., MORRISON, S.J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer*, v.3, p.895-902, 2003.

99. PARHAM, P. *Estrutura dos Anticorpos e Geração da Diversidade das Células B*. In: PARHAM P. *O Sistema Imune*. 1st ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. Cap. 2, p. 31-54.

100. PARHAM, P. *Desenvolvimento dos Linfócitos B*. In: PARHAM P. *O Sistema Imune*. 1st ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. Cap. 4, p. 85-105.

101. PASCUAL, V., LIU, Y.J., MAGALSKI, A., DE BOUTEILLER, O., BANCHEREAU, J., CAPRA, J.D. Analysis of somatic mutation in five b cell subsets of human tonsil. *J Exp Med.*, v.180, p.329-339, 1994.

102. PASSEGUÉ, E., JAMIESON, C.H., AILLES, L.E., WEISSMAN, I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA.*, Washington, v.100, p.11842-11849, 2003.

103. PELED, A., KOLLET, O., PONOMARYOV, T., PETIT, I., FRANITZA, S., GRABOVSKY, V., SLAV, M.M., NAGLER, A., LIDER, O., ALON, R., ZIPORI, D., LAPIDOT, T. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, v.95, p.3289-3296, 2000.

104. PETTITT, A.R., MORAN, E.C., CAWLEY, J.C. Homotypic interactions protect chronic lymphocytic leukaemia cells from spontaneous death in vitro. *Leuk Res.*, v.25, p.1003-1012, 2001.

105. PUNZEL, M., LIU, D., ZHANG, T., ECKSTEIN, V., MIESALA, K., HO, A.D. The symmetry of initial divisions of human hematopoietic progenitors is altered only by the cellular microenvironment. *Exp Hematol.*, v.31, p.339-347, 2003.

106. QUESENBERRY, P.J., CRITTENDEN, R.B., LOWRY, P., KITTLER, R.W., RAO, S., PETERS, S., RAMSHAW, H., STEWART, F.M. In vitro and in vivo studies of stromal niches. *Blood Cells*, v.20, p.97-104, 1994.

107. RADAELLI, A., LASKIN, B.L., STEPHENS, J.M., BOTTEMAN, M.F., PASHOS, C.L.. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care*, v.13, p.279-287, 2004.

108. RAI, K.R., PATEL, D.V. *Chronic Lymphocytic Leukemia*. In: HOFFMAN, R., BENZ, E.J., SHATTIL, S., FURIE, B., COHEN, H.J., SILBERSTEIN, L.E., MCGLAVE, P. *Hematology – Basic Principles and Practice*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 2000. Cap.72, p.1350-1362.

109. RAI, K.R., WASIL, T. *History of Chronic Lymphocytic Leukemia*. In: CHESON, B.D. *Chronic Lymphoid Leukemias*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. Cap.1, p.1-8

RAWSTRON, A.C., GREEN, M.J., KUZMICKI, A., KENNEDY, B., FENTON, J.A., EVANS, P.A., O'CONNOR, S.J., RICHARDS, S.J., MORGAN, G.J., JACK, A.S., HILLMEN, P. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*, v.100, p.635–639, 2002a.

110. RAWSTRON, A.C., YUILLE, M.R., FULLER, J., CULLEN, M., KENNEDY, B., RICHARDS, S.J., JACK, A.S., MATUTES, E., CATOVSKY, D., HILLMEN, P., et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood*, v.100, p.2289-2290, 2002b.

111. RICHARDSON, S.J., MATTHEWA, C., CATHERWOOD, M.A., ALEXANDER, H.D., CAREY, B.S., FARRUGIA, J., GARDINER, A., MOULD, S., OSCIER, D., COPPLESTONE, J.A., et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, v.107, p.3584-3592, 2006.

112. ROSENWALD, A., ALIZADEH, A.A, WIDHOPF, G., SIMON, R., DAVIS, R.E., YU, X., YANG, L., PICKERAL, O.K., RASSENTI, L.Z., POWELL, J., et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.*, v.194, p.1639-1647, 2001.

113. ROSSI, M.I.D., YOKOTA, T., MEDINA, K.L., GARRET, K.P., COMP, P.C., SCHIPUL, A.H., KINCADE, P.W. B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood*, v.101, n.2, p.576-584, 2003.

114. ROSSI, M.I.D., BARROS, A.P., BAPTISTA, L.S., GARZONI, L.R., MEIRELLES, M.N., TAKIYA, C.M., PASCARELLI, B.M., DUTRA, H.S., BOROJEVIC, R. Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional *in vitro* culture system for the study of hematopoietic cell migration. *Braz J Med Biol Res.*, v.38, p.1455-1462, 2005.

115. SCHROEDER, H.W., DIGHIRO, G. The pathogenesis of chronic Lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today*, v.15, p.288-294, 1994.

116. SCHWARTZ, M.A., SCHALLER, M.D., GINSBERG, M.H.. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, v.11, p.549-599, 1995.

117. SGAMBATI, M.T., LINET, M.S., DEVESA, S.S. *Chronic Lymphocytic leukemia: Epidemiological, Familial and Genetic Aspects*. In: CHESON, B.D. *Chronic Lymphoid Leukemias*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. Cap.3, p.33-62.

118. STEVENSON, F.K., CALIGARIS-CAPPIO, F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, v.103, p.4389-4395, 2004.

119. SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGY AND END RESULTS. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Disponível em: <<http://seer.cancer.gov>>. Acesso em 25 set. 2007.

120. TILL, K.J., LIN, K., ZUZEL, M., CAWLEY, J.C. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*, v.99, p.2977-2984, 2002.

121. TRENTIN, L., AGOSTINI, C., FACCO, M., PIAZZA, F., PERIN, A., SIVIERO, M., GURRIERI, C., GALVAN, S., ADAMI, F., ZAMBELLO, R., et al. The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J Clin Invest.*, v.104, p.115-121, 1999.

122. TSUKADA, N., BURGER, J.A., ZVAIFLER, N.J., KIPPS, T.J. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v.99, p.1030-1037, 2002.

123. VEGA, F., MEDEIROS, L.J., LANG, W.H., MANSOOR, A., BUESO-RAMOS, C. JONES, D. The stromal composition of malignant lymphoid aggregates in bone marrow: variations in architecture and phenotype in different B-cell tumors. *Br J Haematol.*, v.117, p.569-576, 2002.

124. VERFAILLIE, C.M. *Anatomy and Physiology of Hematopoiesis*. In: HOFFMAN, R., BENZ, E.J., SHATTIL, S., FURIE, B., COHEN, H.J., SILBERSTEIN, L.E., MCGLAVE, P. *Hematology – Basic Principles and Practice*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 2000. Cap. 13, p. 139-154.

125. WEAVER, V.M., PETERSEN, O.W., WANG, F., LARABELL, C.A., BRIAND, P., DAMSKY, C., BISSELL, M.J. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol.*, v.137, p.231-245, 1997.

126. WEISS, L. The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat Rec.*, v.186, n.2, p.161-184, Oct. 1976.

127. WHITLOCK, C.A., WITTE, O.N. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v.79, p.3608-3612, 1982.

128. WITTE, P.L., ROBINSON, M., HENLEY, A., LOW, M.G., STIERS, D.L., PERKINS, S., FLEISCHMAN, R.A., KINCADE, P.W.. Relationships between B-lineage lymphocytes and stromal cells in long-term bone marrow cultures. *Eur J Immunol.*, v.17, p.1473-1484, 1987.

129. WOLF, K., MAZO, I., LEUNG, H., ENGELKE, K., VON ANDRIAN, U.H., DERYUGINA, E.I., STRONGIN, A.Y., BRÖCKER, E.B., FRIEDL, P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboïd transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.*, v.160, p.267-277, 2003.

130. YAMAMOTO, M., FIGUEIREDO, V.L.P. Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.25, p.229-232, 2005.

8) ANEXOS

1) Ficha dos Pacientes

Identificação:

Nome: _____

Instituição: _____ Matrícula: _____

Médico: _____ Data da admissão: _____

Sexo: ()M ()F Idade: _____ Data do diagnóstico: _____

Dados clínicos e laboratoriais:

Estaqiamento: Binet _____ no diagnóstico, Binet _____ na admissão

Leucócitos: _____/mm³ no diagnóstico, _____/mm³ na admissão

Tempo de duplicação: _____ b2-microglobulina: _____

Fenótipagem:

Data: ____/____/____, laboratório: _____

Ig: ____% classe ____	CD19: ____%	CD38: ____%	Outros:
K: ____%	CD20: ____%	CD49d: ____%	_____
λ : ____%	CD22: ____%	CD79b: ____%	_____
CD2: ____%	CD23: ____%	FMC-7: ____%	_____
CD5: ____%	CD27: ____%	ZAP-70: ____%	

Ensaio:

[illegible][illegible][illegible]

2) Termo de Consentimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você, paciente em tratamento de Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, está sendo convidado a participar do estudo “ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA-B EM CULTURA BI- E TRI-DIMENSIONAL DE ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA”, executado pelo Dr. Leandro Dutra Borges de Almeida sob orientação dos Profs. Maria Isabel Doria Rossi e Néelson Spector.

A LLC é uma doença caracterizada pelo aumento de linfócitos maduros na medula óssea e sangue periférico podendo causar aumento dos gânglios, do fígado e do baço, anemia e diminuição das plaquetas. O mecanismo de transformação do linfócito normal em linfócito leucêmico não está esclarecido, entretanto os estudos sobre estes linfócitos demonstram que ele rapidamente morre quando isolados em cultura. A adição de alguns tipos celulares a esta cultura permite que o linfócito leucêmico sobreviva por tempo maior. Este dado demonstra que o comportamento do linfócito leucêmico depende do ambiente onde ele se encontra.

Neste estudo, as células da leucemia presentes no sangue serão obtidas por coleta de 10ml sangue (por punções semelhantes às de exames de sangue). Elas serão armazenadas na forma congelada para serem utilizadas por ocasião da realização dos testes. Em momento oportuno, as células da leucemia serão cultivadas juntamente com células do estroma de medula óssea humano para avaliar o papel do estroma na proteção à morte celular da leucemia. O objetivo deste estudo é ajudar a esclarecer os mecanismos da doença.

Nenhuma modificação do tratamento será exigida, os participantes não serão expostos a nenhum risco, exceto àqueles advindos de uma coleta de sangue, não será cobrado nenhum tipo de benefício pelos custos do estudo e as células armazenadas serão utilizadas apenas para os propósitos deste estudo.

(frente)

Eu, _____, declaro ter sido suficientemente informado a respeito das informações do estudo acima. Os detalhes sobre este estudo foram analisados comigo e recebi uma cópia deste documento. Em particular, fui informado dos seguintes aspectos:

1. Tenho ampla liberdade de recusar-me a participar do estudo ou retirar meu consentimento em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo da continuidade do meu tratamento;
2. Tenho garantia de receber esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer;
3. Tenho a garantia de sigilo que assegure a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicação científica;
4. Tenho garantia de acesso ao médico responsável pelo estudo e ao respectivo comitê de ética institucional, quando necessário. O médico responsável é o Dr. Leandro Dutra Borges de Almeida que pode ser localizado através do telefone 32 3211-3591 ou e-mail drleandro@uol.com.br, e na sua ausência os seguintes membros do Serviço de Hematologia: Prof. Nelson Spector, Prof. Wolmar Pulcheri, Prof. Márcio Nucci, Prof. Ângelo Maiolino, Prof. Rodrigo Portugal, Profa. Monique Morgado, Prof. Rony Schaffel, Profa. Irene Biasoli, que podem ser localizados através dos seguintes telefones: 2562-2711, 2562-2460.

Portanto, concordo em participar do estudo autorizando a equipe médica responsável, à coleta de sangue para exames, coleta dos dados e se necessário o armazenamento do material biológico.

Paciente

Médico

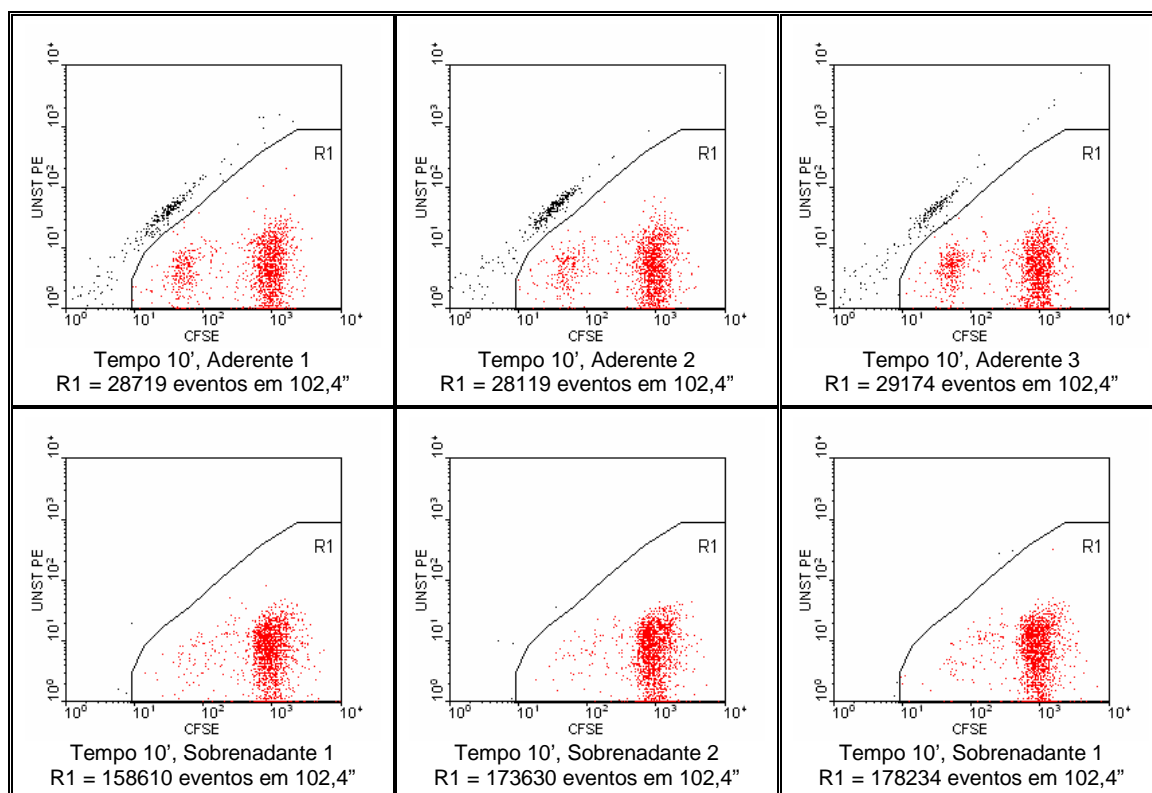
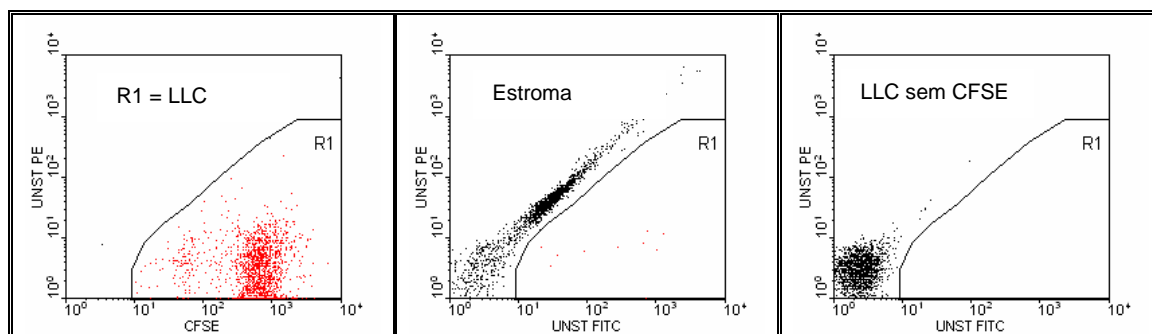
Testemunha

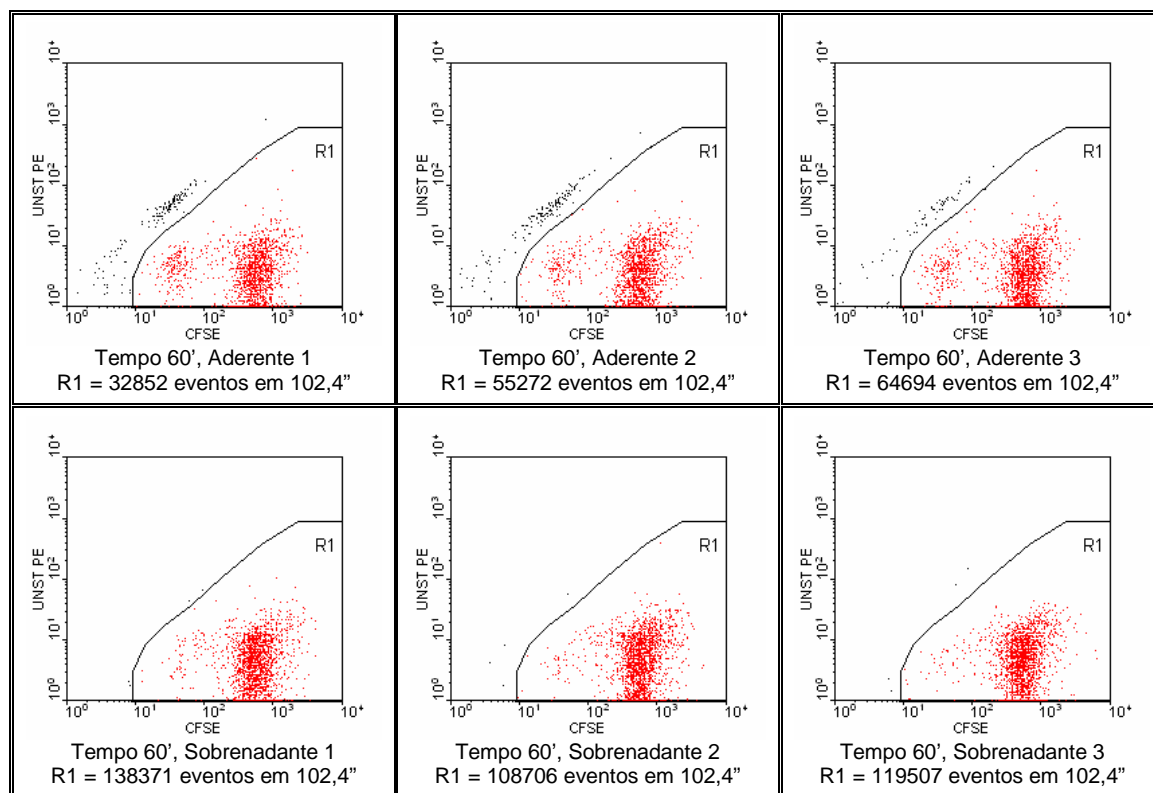
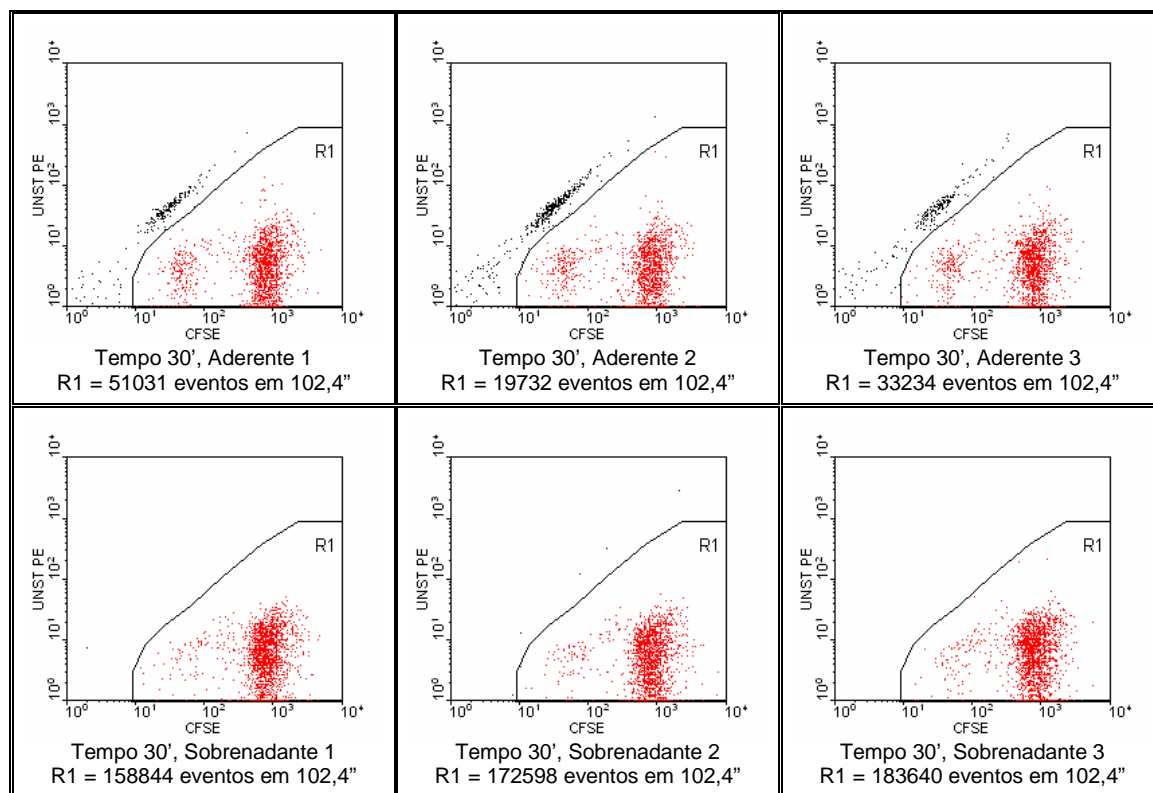
Data

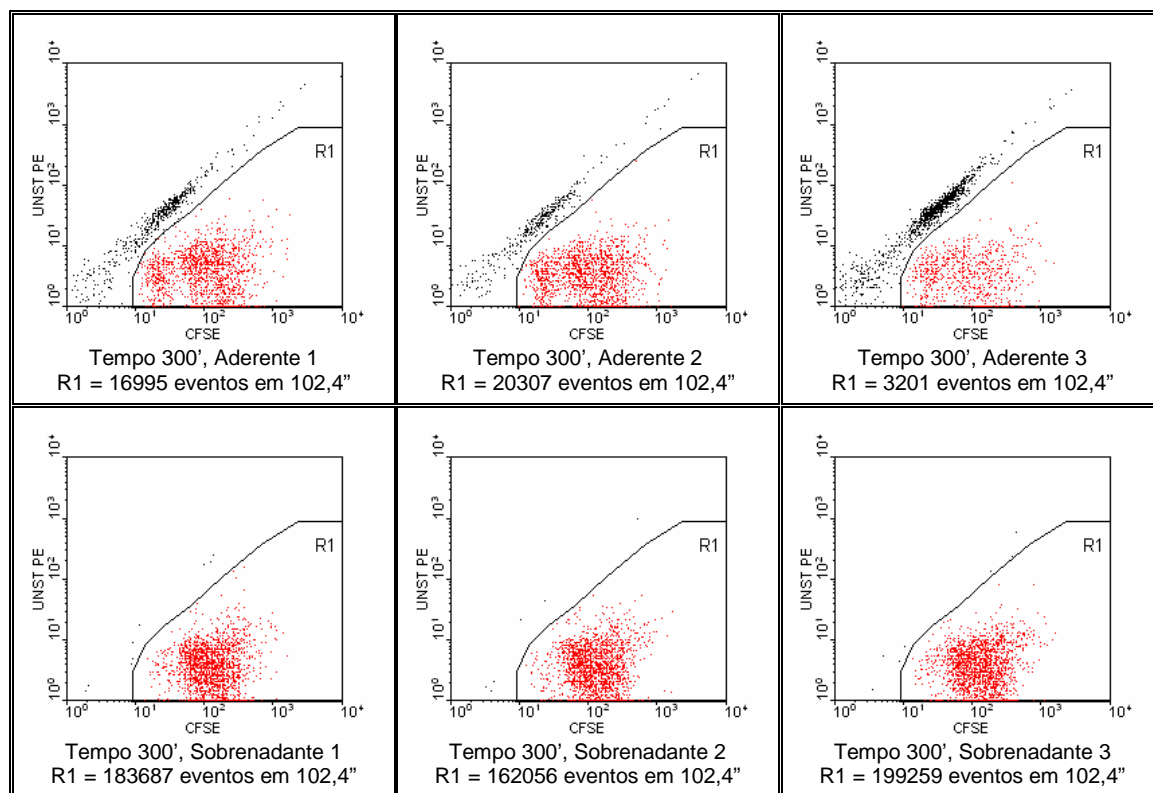
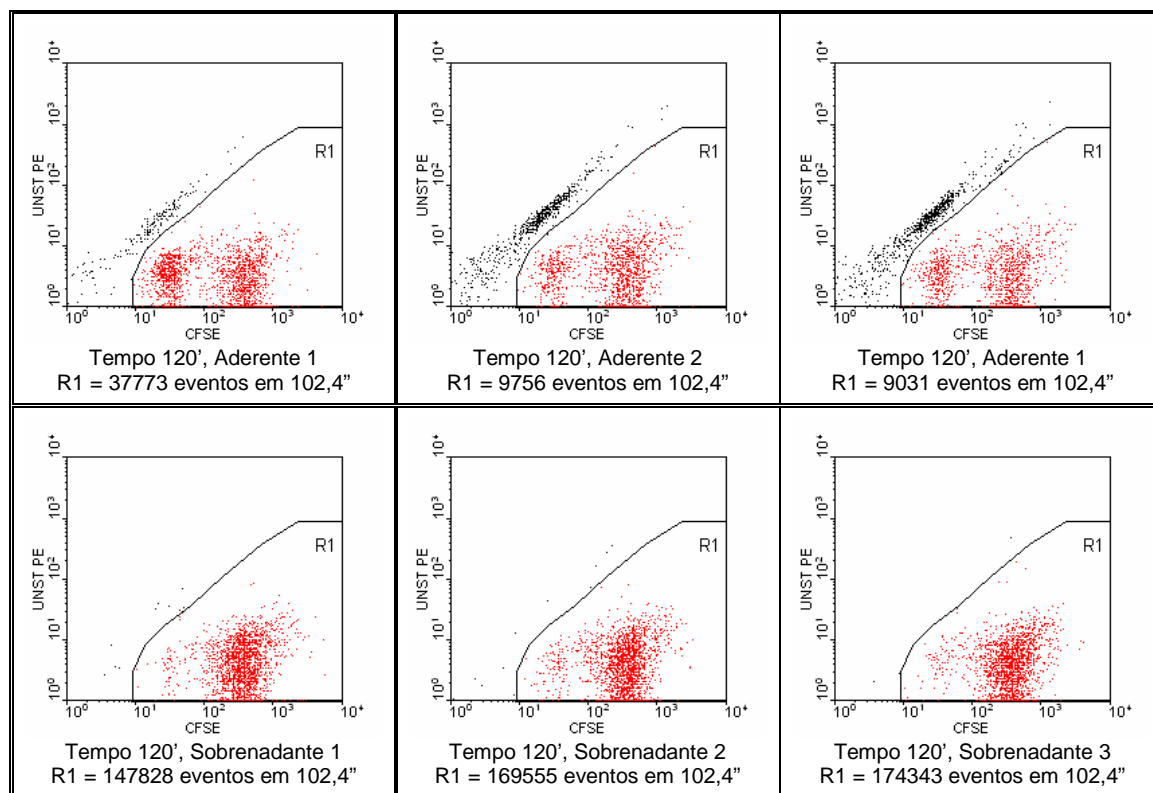
(verso)

3) Exemplo do Experimento de Migração

Amostra 17







4) Pôster apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia de 2005



A CAPACIDADE DE MIGRAR EM MODELO TRIDIMENSIONAL DE CULTURA DE CÉLULAS DE ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA É ESPECÍFICA DE UMA SUBPOPULAÇÃO DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA

LDB Almeida¹, APDN Barros², LS Baptista², R Borojevic³, N Spector⁴, MID Rossi³

¹Pós-Graduação em Clínica Médica, ²Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, ³Dept. de Histologia e Embriologia, ⁴Dept. Clínica Médica - UFRJ

INTRODUÇÃO: A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma doença caracterizada pela expansão clonal de linfócitos B com o fenótipo CD5+, CD23+ e fraca expressão de imunoglobulina de superfície e CD79b, que infiltram medula óssea, sangue periférico e órgãos linfóides secundários.

Devido ao fenótipo e ao quadro clínico indolente, visto na maioria dos casos, acreditava-se que a LLC era uma patologia de acúmulo de linfócitos maduros inativos que sofrem transição e adquiriram vantagem anti-apoptótica. No entanto, estudos recentes em biologia celular e molecular sugerem que as células da LLC são células que foram estimuladas por antígenos e que a sua capacidade de responder a estímulos externos é fundamental para sua sobrevivência e progressão. Por isso, nos vários órgãos acometidos, onde diferentes interações celulares se estabelecem, a taxa de proliferação e morte das células da LLC varia. Por exemplo, há maior proliferação na medula óssea enquanto que no sangue periférico há morte, as manchas de Gumprecht. Assim, a infiltração medular estaria ligada à manutenção da leucemia e ao seu prognóstico.

A interação entre células leucêmicas e o estroma medular tem sido investigada *in vitro* em sistemas de cultura bidimensionais. Nestes sistemas, verificou-se que as células da LLC migram rapidamente por entre a monocamada de células de estroma medular e que o contato célula-célula as protege da morte celular. Contudo, *in vivo*, a migração transmedular envolve o contato com a superfície das células estromais que formam um *continuum* tridimensional.

OBJETIVO: Estabelecer um modo de co-cultura bi e tridimensional entre estroma de medula de migrar neste sistema.

PACIENTES E MÉTODOS: Participaram do estudo pacientes com diagnóstico de LLC segundo critérios da OMS, sem tratamento, após assinarem consentimento informado. As amostras de células estromais foram obtidas de doadores de medula óssea do HUCFF-UFRJ.

Foram coletados 10ml de sangue periférico com heparina. As células mononucleares foram separadas por gradiente de Ficoll e criopreservadas até o momento do uso. No descongelamento, verificamos que >98% das células eram leucêmicas.

As células de estroma de medula foram obtidas por adesão em plástico após hemossedimentação. A fração aderente foi mantida em meio Iscove's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e antibióticos a 37°C com 5% de CO₂.

Para verificar a capacidade de migração das células de LLC em sistemas bi e tridimensional, estas foram distribuídas sobre monocamada ou esteróide de estroma medular, respectivamente. Os esteróides são agregados celulares tridimensionais, como já demonstrado (Fig. 1), que se formam a partir de suspensão celular em sistema que favorece a agregação celular e ao impedir a adesão ao plástico.

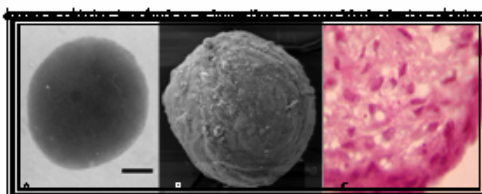


Figura 1. Aspecto das esteróides de estroma de medula óssea. (A) Contraste de fase. Barra = 100µm; (B) Microscopia de fase de varredura mostrando a superfície do esteróide; (C) Microscopia ótica. H-E. Aumento original 400X.

RESULTADOS:

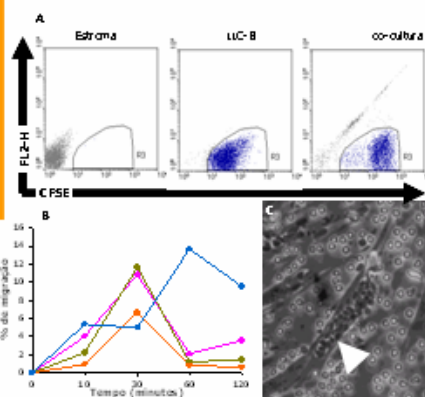


Figura 2. As células de LLC-B migram rapidamente por entre a monocamada de células de estroma de medula óssea. As células leucêmicas foram previamente marcadas com CFSE e distribuídas sobre monocamadas de estroma de medula óssea. Em diferentes intervalos de tempo as células do sobrenadante foram retiradas e a monocamada foi exclusivamente lavada para remoção das células não aderentes. Em seguida, a monocamada foi submetida a digestão enzimática por tripsina. Ambas populações foram centrifugadas e resuspensas rigorosamente em 400µl para quantificação por difusão de fluxo, tendo o tempo como parâmetro de avaliação. O percentual de migração foi calculado com base no número de eventos CFSE⁺ na monocamada em relação ao total (sobrenadante e monocamada). (A) Análise por FACS da migração celular, mostrando as células de estroma não marcadas, as células de LLC-B no sobrenadante e a co-cultura. (B) marca os eventos CFSE⁺. (C) Cinética e percentual de migração em relação ao total aplicado de 4 diferentes pacientes; (C) Contraste de fase da co-cultura mostrando as células leucêmicas em contato com células de estroma (seta).

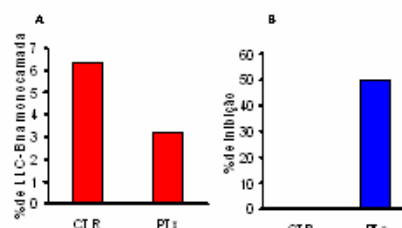


Figura 3. A migração das células de LLC-B na monocamada é dependente de proteína G. As células de LLC-B foram marcadas com CFSE e distribuídas sobre monocamadas de estroma de medula óssea, como descrito anteriormente, na presença ou não de 200 ng/ml de toxina Pertussis (PTx), um inibidor de proteína G, e, portanto, da atividade de proteína G, ligada à sinalização ao receptor de quinidina (SP-1), o CXCR4. Após 2h de co-cultura, as células do sobrenadante foram retiradas e a monocamada foi exclusivamente lavada e triplicadas para análise da migração por FACS. (A) o percentual de células de LLC-B na monocamada no controle, sem PTx, e na presença de PTx é mostrado; (B) Mostra o percentual de inibição de migração da PTx. A figura representa um experimento com triplicatas.

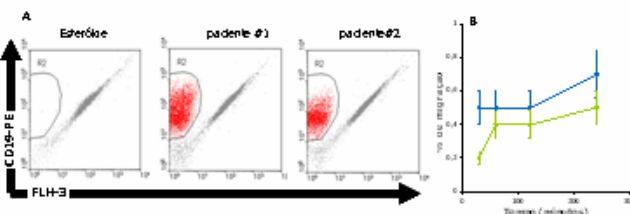


Figura 4. As células de LLC-B migram em modelo tridimensional. As células leucêmicas foram distribuídas sobre os esteróides de estroma de medula óssea pré-formados e a intervalos de tempos as células do sobrenadante foram retiradas e os esteróides foram lavados e digeridos enzimaticamente. As células foram então incubadas com anticorpo anti-CD39 para análise, por FACS, da migração. Como descrito anteriormente, o volume para avaliação foi rigorosamente ajustado e o tempo foi utilizado como parâmetro para a avaliação. (A) Análise de FACS mostrando controle de esteróide dissociado e esteróide co-cultivo com células de LLC-B de dois diferentes pacientes. (B) mostra os eventos CD39⁺ nos esteróides; (B) A cinética e o percentual de migração nos esteróides, calculado em relação ao total aplicado, de dois diferentes pacientes é mostrado.

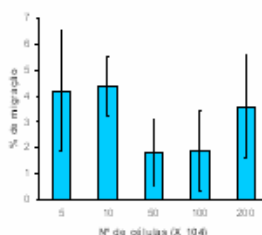


Figura 5. Apenas uma subpopulação de células de LLC-B migra em modelo tridimensional de cultura. Com o intuito de verificar se o resultado percentual de migração em modelo 3D se devia a uma saturação do modelo em relação ao número de células de leucemia aplicadas, diferentes concentrações de células de LLC-B previamente marcadas com CFSE foram distribuídas sobre os esteróides de estroma de medula óssea. Após 2h de co-cultura, as células do sobrenadante foram retiradas e os esteróides foram lavados e dissociados por digestão enzimática para análise por FACS, como descrito anteriormente. O percentual de migração em relação ao total de células aplicado não variou em função da concentração celular. A figura é representativa de triplicatas de dois experimentos independentes.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO: Em modelo bidimensional, as células de LLC-B migram por entre as células de estroma de medula óssea de forma dependente da atividade de proteína G, mas, ao contrário do descrito na literatura, nossos resultados preliminares demonstram um pico de migração que variou entre 30 e 60 minutos. Curiosamente, em modelo 3D, somente uma pequena população de células leucêmicas foi capaz de migrar e este percentual se manteve constante independentemente do número de células leucêmicas aplicado, sugerindo que somente uma subpopulação é capaz de fazer migração transmedular. O papel de moléculas de adesão e quimiotática está sendo investigado.

APOIO: CAPES, FAPERJ e CNPq

5) Análise Estatística (SPSS 13.0)

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Sexo * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA	14	100,0%	0	,0%	14	100,0%

Sexo * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA

Crosstabulation

Count	% MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA		Total
	n	s	
Sexo F	4	1	5
M	6	3	9
Total	10	4	14

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,280(b)	1	,597		
Continuity Correction(a)	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,290	1	,590		
Fisher's Exact Test				1,000	,545
N of Valid Cases	14				

a Computed only for a 2x2 table

b 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,43.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Idade na admissão categorizada * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA	14	100,0%	0	,0%	14	100,0%

Idade na admissão categorizada * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA
Crosstabulation

Count	% MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA		Total
	n	s	
Idade na admissão a	2	4	6
categorizada b	8	0	8
Total	10	4	14

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7,467(b)	1	,006		
Continuity Correction(a)	4,557	1	,033		
Likelihood Ratio	9,113	1	,003		
Fisher's Exact Test				,015	,015
N of Valid Cases	14				

a Computed only for a 2x2 table

b 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,71.

Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Tempo de <i>follow-up</i> da doença (meses) * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA	6	42,9%	8	57,1%	14	100,0%

Report - Tempo de *follow-up* da doença (meses)

% MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA	Mean	N	Std. Deviation
n	45,60	5	36,398
s	24,00	1	.
Total	42,00	6	33,728

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
tempo de <i>follow-up</i> categorizado * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA	14	100,0%	0	,0%	14	100,0%

tempo de *follow-up* categorizado * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA**Crosstabulation**

Count	% MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA		Total
	n	s	
tempo de <i>follow-up</i> n	5	3	8
categorizado s	5	1	6
Total	10	4	14

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,729(b)	1	,393		
Continuity Correction(a)	,066	1	,798		
Likelihood Ratio	,760	1	,383		
Fisher's Exact Test				,580	,406
N of Valid Cases	14				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,71.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Estágio na admissão * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA	14	100,0%	0	,0%	14	100,0%

Estágio na admissão * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA

Crosstabulation

Count	% MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA		Total
	n	s	
Estágio na A	4	2	6
admissão B	4	2	6
C	2	0	2
Total	10	4	14

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	,933(a)	2	,627
Likelihood Ratio	1,475	2	,478
N of Valid Cases	14		

a. 6 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,57.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Estágio na admissão * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA	14	100,0%	0	,0%	14	100,0%

Estágio na admissão * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA

Crosstabulation

Count		% MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA		Total
		n	s	
Estágio na A+B		8	4	12
admissão C		2	0	2
Total		10	4	14

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,933(b)	1	,334		
Continuity Correction(a)	,015	1	,904		
Likelihood Ratio	1,475	1	,225		
Fisher's Exact Test				1,000	,495
N of Valid Cases	14				

a Computed only for a 2x2 table

b 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,57.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Progressão * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA	6	42,9%	8	57,1%	14	100,0%

Progressão * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA

Crosstabulation

Count		% MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA		Total
		n	s	
Progressão n		1	1	2
s		4	0	4
Total		5	1	6

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig.	Exact Sig.	Exact Sig.
--	-------	----	-------------	------------	------------

			(2-sided)	(2-sided)	(1-sided)
Pearson Chi-Square	2,400(b)	1	,121		
Continuity Correction(a)	,150	1	,699		
Likelihood Ratio	2,634	1	,105		
Fisher's Exact Test				,333	,333
N of Valid Cases	6				

a Computed only for a 2x2 table

b 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,33.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Leuco categorizado conforme a média * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA	14	100,0%	0	,0%	14	100,0%

Leuco categorizado conforme a média * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA

Crosstabulation

Count	% MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA		Total
	n	s	
Leuco categorizado a	7	2	9
conforme a média b	3	2	5
Total	10	4	14

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,498(b)	1	,480		
Continuity Correction(a)	,008	1	,930		
Likelihood Ratio	,487	1	,485		
Fisher's Exact Test				,580	,455
N of Valid Cases	14				

a Computed only for a 2x2 table

b 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,43.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
CD38 * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA	10	71,4%	4	28,6%	14	100,0%

CD38 * % MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA**Crosstabulation**

		% MÁXIMO MIGRADO EM MONOCAMADA		Total
		n	s	
CD38	n	3	2	5
	s	3	2	5
Total		6	4	10

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,000(b)	1	1,000		
Continuity Correction(a)	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,000	1	1,000		
Fisher's Exact Test				1,000	,738
N of Valid Cases	10				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,00.