

## Resumo de Tese/Thesis

**Efeitos do STI571 e da citarabina sobre a proliferação e a seleção "in-vitro" de células progenitoras hematopoéticas na leucemia mielóide crônica A****Effects of STI571 and cytarabine in hematopoietic progenitor cell proliferation and "in-vitro" selection in chronic myeloid leukemia.**

Marina A. Coutinho

Orientador

Dimas T. Covas

## Resumo

Os objetivos deste estudo foram avaliar, com metodologia de cultivo in-vitro de progenitores hematopoéticos, o efeito das drogas STI571 e citarabina sobre a proliferação de células mononucleares de pacientes com leucemia mielóide crônica, o crescimento de colônias hematopoéticas CFU-GM, estudar por método de citometria de fluxo a porcentagem de células apoptóticas e identificar a presença do gene de fusão BCR/ABL nas colônias sobreviventes por RT-PCR e FISH nas amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica após exposição das células à citarabina e STI571 a cada tempo e concentração determinada das drogas. Foi utilizado, como material, sangue periférico e medula óssea, obtida por punção aspirativa esternal ou da crista ilíaca posterior, de pacientes com LMC Ph positivo na fase crônica, durante o processo clínico de tratamento e avaliação. Sangue periférico de doadores voluntários normais usados como controle. Células mononucleares de sangue periférico e medula óssea foram separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque, submetidas a tratamento com as drogas citarabina e STI571 em diferentes concentrações e pelos tempos de 24, 48

e 72 horas, avaliadas quanto à proliferação, crescimento de colônias CFU-GM, apoptose e identificação da progênie pelas técnicas de FISH e RT-PCR. Nos ensaios de proliferação, a citarabina teve efeito inibitório não seletivo proporcionalmente à dose, mas não em relação ao tempo de exposição, tanto em controles normais, como na LMC. O STI571 foi também dose dependente e não tempo dependente, no entanto houve efeito seletivo sobre as células LMC em baixas doses; em dose elevada inibiu também os controles normais. Nos ensaios clonogênicos, a citarabina demonstrou efeito inibitório dose e tempo dependente e não seletivo, quanto ao STI571, não se demonstrou diferença estatisticamente significativa entre tempo e dose nas células da LMC, também com efeito seletivo em baixas doses, sobre estas células. A quantificação da apoptose não demonstrou diferença significativa na maioria dos ensaios. RT-PCR BCR/ABL realizado em 16 colônias mostrou-se positivo em 12 e negativo em 4 colônias. Positividade pelo FISH foi encontrada em 18 colônias, resultado inconclusivo em 4 e não informativo em 4. Em nenhum caso foi definitivamente negativo. O desenvolvimento desse trabalho demonstrou a factibilidade do emprego desse conjunto de metodologias para o estudo de modalidades terapêuticas da LMC e demonstração do efeito clonal seletivo dessas terapias.

Palavras-chave: Leucemia mielóide crônica; células progenitoras hematopoéticas; ensaio clonogênico; proliferação; citarabina; STI571; RT-PCR; hibridização in-situ por fluorescência; BCR/ABL.

Dissertação para obtenção do título de mestrado em Hematologia pelo Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Correspondência para: Marina A. Coutinho  
Falta o endereço

### Summary

The goals of this study were to assess using the in-vitro hematopoietic progenitor cells culture method, the effects of STI571 and cytarabine in chronic myeloid leukemia (CML) patients' mononuclear cells, investigating the behavior of the growth of hematopoietic colonies CFU-GM, studying the percentage of apoptotic cells after treatment by flow cytometry and identifying the presence of the fusion gene BCR/ABL by RT-PCR and FISH in the survival CML colonies after exposure to STI571 and cytarabine at different times and drug concentrations. The materials used were CML Ph positive peripheral blood and bone marrow from patients in first chronic phase, collected by sternal or posterior iliac crest puncture, during the clinical evaluation process. Healthy volunteers' peripheral blood was used as a control. Peripheral blood and bone marrow mononuclear cells were separated by Ficoll-Hypaque gradient, and received in-vitro treatment with STI571 and cytarabine at different concentrations for 24, 48 and 72 hours, and assessed after that for proliferation index, CFU-GM colonies growth, percentage of apoptotic cells and identification of the fusion gene BCR/ABL by FISH and RT-PCR. By the proliferative assays, we could demonstrate that cytarabine had a non-selective inhibitory effect proportional to the drug dosage, but not related with

exposure time, both for normal and for CML cells. STI571 was dose dependent also and not time dependent, however, showed a selective effect over CML cells in lower doses and with high doses inhibited normal control cells at the same way. By clonogenic assay, cytarabine showed a dose and time dependent and non-selective inhibitory effect. No statistic difference was seen by the same assay under STI571 treatment, comparing times and doses of the drug. It showed, in the same way, selective effect in lower doses in CML cells. Apoptosis quantification was not statistically significant in the majority of experiments. RT-PCR BCR/ABL performed on 16 colonies was positive in 12 and negative in 4 colonies. Positivity by FISH was found in 18 colonies, inconclusive in 4 and non-informative in 4. FISH was not definitely negative in any colony. The development of this research showed the availability of this group of techniques for the study of a variety of therapeutic modalities for CML.

**Key words:** Chronic myeloid leukemia; hematopoietic progenitor cells; clonogenic assay; proliferation; cytarabine; STI571; RT-PCR; fluorescent in-situ hybridization; BCR/ABL.

Recebido em  
Aceito em