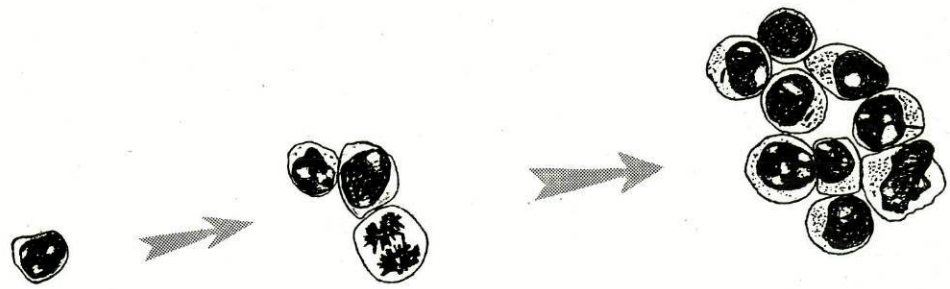
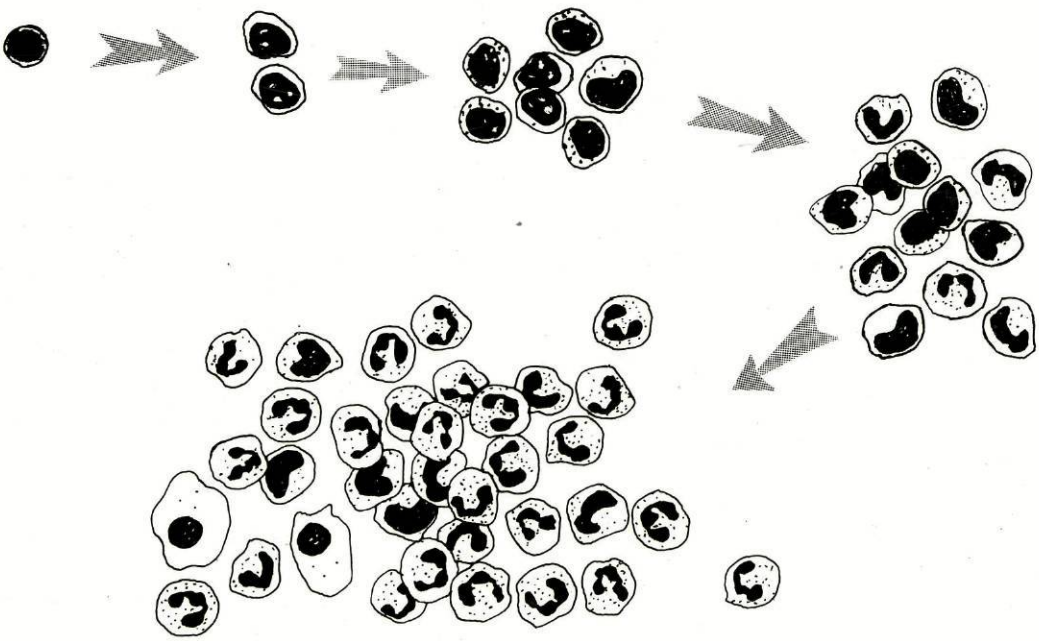
JOSÉ EDUARDO TORRES DE ECKENROTH GUIMARÃES



O EQUILÍBRIO PROLIFERAÇÃO/DIFERENCIAÇÃO NA HEMOPOIESE NORMAL E LEUCÉMICA



PORTO
1 9 8 7

JOSÉ EDUARDO TORRES DE ECKENROTH GUIMARÃES

O EQUILÍBRIO PROLIFERAÇÃO/DIFERENCIAÇÃO NA HEMOPOIESE NORMAL E LEUCÉMICA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM MEDICINA

PORTO
1 9 8 7

A meus Pais

A minha Mulher

A meus Filhos

Artº 48º, § 3º — A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.

(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 28 de Janeiro de 1951 - Decreto nº 19337)

ÍNDICE

PREFÁCIO ..... *I*

INTRODUÇÃO 1

MATERIAIS E MÉTODOS 17

RESULTADOS 39

DISCUSSÃO 83

POSFÁCIO 119

SUMMARY 123

REFERÊNCIAS 127

PREFÁCIO

O desejo de fazer investigação sobre as causas ou origens do cancro esteve na base da minha ida para Inglaterra. Ao clínico empenhado numa disciplina oncológica as dúvidas deparam-se, as interrogações somam-se e o imenso vazio daquilo que se desconhece estimula. Não é sem encanto porém que alguém que caminha da medicina clínica para a biologia celular ou molecular verifica que as "soluções" que aparentemente estão ali tão perto, tão à mão, progressivamente se distanciam e se desfiguram numa sedução tantas vezes tantálica. A ciência torna-se o lugar geométrico de todas as dúvidas: às (poucas) certezas substitui-se a relatividade do conhecimento e é dessa inquietação lúdica que nasce a procura. Sem pudor, avança-se pela fecundidade do imprevisto até chegar à fatuidade mágica da descoberta. Aí, tornado insaciedade, o instinto perpetua-se, febril, iterativo, veloz... Ciclicamente perturbador.

E quantas vezes nos redescobrimos nessa busca libidinosa da intimidade frágil das coisas!

Não foi, no entanto, sem sobressalto que fui para Inglaterra. Nem aquilo que projectei foi pacificamente conseguido. E não me posso esquecer que naqueles momentos, antes de partir, em que os obstáculos se amontoavam e a desistência parecia a solução mais fácil, foram os meus Pais e a minha Mulher que me deram o alento para prosseguir. Nem uma palavra de retracção, nem uma reticência... É a isso, junto a uma obstinação que crescia exponencialmente com as dificuldades, que se deve o facto de alguma vez esta tese ter sido escrita.

A minha Mulher devo ainda o ter estado sempre ao meu lado, irredutivelmente, nas horas boas e más. A nossa vida nunca é inteiramente nossa, é um pouco, ou muito, de todos aqueles com quem interactuamos, excitados átomos absorvendo ou cedendo energia. Por isso, esta dissertação é dela também.

Apesar de tudo, nada teria conseguido se não tivesse deparado com um ambiente de compreensão e simpatia. Ao Prof. A. V. Hoffbrand a minha gratidão pela forma como me acolheu no seu Departamento e pelo seu interesse ao longo dos anos. Ao Wellcome Trust - Fundação legada pelo falecido Sir Harry Wellcome - o meu agradecimento por me ter permitido, no primeiro ano de estadia, ultrapassar o limiar da sobrevivência económica.

No Reino Unido, terra natal dos meus filhos, revejo a tolerância e o liberalismo generoso que têm facultado a tantos estrangeiros lá trabalhar e viver.

Gillie Francis iniciou-me na técnica e no método experimental. O espírito rigoroso da escola científica inglesa marcou a minha vida no seu laboratório sem que, contudo, isso afogasse o humor ou a imaginação. De muitas discussões, quase polémicas, que tive com ela nasceram ideias em que se basearam vários dos trabalhos executados e alguns dos conceitos expendidos. Para Jo Berney e Mike Wing, companheiros de todas as horas e amigos, vai igualmente o meu reconhecimento. Com eles aprendi, deles recebi ajuda quando ensaiei os meus passos sozinho. Também um abraço amigo para Andrea Piga que comigo colaborou num trabalho, realizando os estudos de incorporação de timidina.

Em geral, de todo o Departamento de Hematologia recebi provas de amizade e ajuda. Gostaria tão somente de destacar o sector clínico, que personalizo em Grant Prentice e no Prof. Hoffbrand, por ter auxiliado nos estudos que envolveram doentes, tanto na colheita de espécimes como na recolha de dados clínicos. O meu agradecimento também para o laboratório de rotina, nomeadamente para Martine Laulicht que realizou alguns doseamentos de ferritina por radioimunoensaio.

Este capítulo não poderá encerrar sem que relembre outras pessoas que, através de cartas de recomendação ou contactos pessoais, tiveram influência na minha ida para Inglaterra: a Drª Manuela Mendes Ribeiro, o Prof. Pina Cabral e o Dr. Gabriel Tamagnini. A minha colega Elisa Granjo apresentou-me ao Prof. Hoffbrand tendo influido decisivamente na minha escolha do Royal Free Hospital. O Dr. A. Rosa Araújo autorizou, como Director de Serviço, a minha permanência em Londres.

De volta a Portugal, encontrei o acolhimento afectuoso do Prof. Falcão de Freitas. Sem ele, as suas críticas e as suas sugestões, este trabalho teria sido sem dúvida mais difícil. A sua paciente disponibilidade, a confiança com que me honrou e uma rara capacidade de intuir o necessário do supérfluo foram um apoio insubstituível. Para ele vai a minha gratidão.

À Faculdade de Medicina do Porto onde regresso, com a apresentação desta dissertação, treze anos após a minha licenciatura, presto homenagem pela sua vitalidade, na pessoa do seu corpo docente.

A todos os meus colegas de Hematologia Clínica, na pessoa da Drª Manuela Mendes Ribeiro, queria agradecer a sua compreensão nesta fase, aliviando-me de muitas tarefas de rotina que me competiam.

E, "last but not the least", salientarei o amigo Prof. Manuel Sobrinho Simões. A amizade não se agradece, retribuiu-se... sempre que possível. Não posso, no entanto, deixar de referir o seu inestimável contributo ao ter revisto crítica e agudamente este manuscrito, no estímulo repetente que nunca autorizou que a vontade me falecesse e através do padrão que o seu valor e prestígio estabeleceram, para a nossa geração, como alvo.

. . .

Inúmeras outras pessoas houve com acção marginal ou tangencial no presente trabalho. Não é porém o facto de não ter havido colaboração activa que reduz a influência que existiu e foi por vezes acentuada. A Profª. Maria de Sousa despertou-me, em 1982 em Boston e posteriormente no Porto, o interesse pelo ferro e proteínas do seu metabolismo. Foi talvez a pessoa que mais me impressionou na busca de uma explicação global para o papel deste elemento no organismo.

Stan Wickremasinghe, Gillie Francis e o Prof. João Monjardino leram e criticaram a hipótese, quando ainda na sua forma inicial. Tenho de reconhecer que as suas dúvidas se somaram ao natural amadurecimento que novos dados experimentais e a incessante informação que submerge o mundo da ciência provocaram, despindo-a de pelo menos parte da sua "naïveté" inicial.

O estímulo é tantas vezes necessário quando temos de enfrentar a aridez de escrever sobre o (pouco) que fizemos. De várias pessoas recebi incentivo que se materializou em conselhos, ideias, gestos ou na palavra amiga. De entre todos, a quem igualmente agradeço, permitir-me-ei individualizar o Dr. Corino de Andrade e o Prof. António Coimbra.

A várias pessoas tenho de agradecer a geralmente desinteressada oferta de produtos e reagentes que possibilitaram a realização de muitas das experiências. Entre eles destaco o Prof. Hal Broxmeyer (University of Indiana, U.S.A.), o Prof. Allan Jacobs e o Dr. Mark Worwood (University of Wales, Cardiff) e o Dr. Ian Trowbridge (Salk Institute, La Jolla, Ca., U.S.A.).

O Departamento de Imunologia do Royal Free Hospital colaborou nalguns trabalhos e esteve, de qualquer modo sempre à nossa disposição, cedendo anticorpos, reagentes e aconselhando tecnicamente. Isto é razão mais que suficiente para estar reconhecido ao Prof. George Janossy e seus colaboradores, nomeadamente Liz Wood, Sylvia Granger, Nick Tidman, Joe Ashley e Dario Campana.

Não posso também deixar de agradecer aos elementos do Departamento de Neurologia do Royal Free Hospital que operaram o FACS nas experiências de citofluorometria efectuadas.

Além do Wellcome Trust, a Royal Free Hospital School of Medicine garantiu-me, através de um contrato como Research Fellow e Honorary Lecturer, o apoio económico necessário para o resto da minha estadia em Londres e subsidiou grande parte dos custos correntes de investigação. A Hoffman-LaRoche subsidiou parte do trabalho com retinoides e indutores da diferenciação e o Leukaemia Research Fund e a Cancer Research Campaign auxiliaram lateralmente ao apoiar economicamente outros membros do grupo de trabalho.

Gostaria ainda de agradecer ao Sr. José Ernesto Guimarães, do departamento científico da Upjohn Portuguesa, o apoio na obtenção de bibliografia e ao pessoal da

Editorial da Associação de Estudantes da F.M.P. o cuidado posto na composição desta tese.

Nesta tese foram utilizados trabalhos que já se encontram publicados na sua forma definitiva ou que foram comunicados em reuniões internacionais e publicados como Abstracts. Em obediência ao preceito legal (Decreto-Lei nº 388/70, Art. 8º, parágrafo 2) passo a citá-los:

- Francis G.E., Guimaraes J.E., Berney J.J., Granger S., Wood E. A., Wing M.A. & Hoffbrand A.V. (1982) T-lymphocyte subsets and partial uncoupling of granulocyte-macrophage progenitor cell differentiation and proliferation in normal cells. Experimental Hematology Review, Experimental Hematology 10 (Suppl. 12), 179-193

- Guimaraes J.E.T.E., Francis G.E., Berney J.J., Wing M.A. & Hoffbrand A.V. (1985) Differentiation of human acute myeloid leukaemia cells in response to exogenous and endogenous stimuli: different patterns of response suggested by a biossay system. Leukemia Research 9, 869-878

- Francis G.E., Guimaraes J.E.T.E., Berney J.J. & Wing M.A. (1985) Synergistic interaction between differentiation inducers and DNA synthesis inhibitors: a new approach to differentiation induction in myelodysplasia and acute myeloid leukaemia. Leukemia Research 9, 573-581

- Guimaraes J.E.T.E., Francis G.E., Berney J.J., Wing M.A. & Hoffbrand A.V. (1984) Leukemia inhibitory activity has a differentiation inducing effect in normal granulomonocytic progenitors. Experimental Hematology 12, 369 (Abstract 31). A versão completa deste trabalho ("Acidic isoferritin stimulates differentiation of normal granulomonocytic progenitors") foi recentemente submetida para publicação, tendo sido condicionalmente aceite.

- Guimaraes J.E., Francis G.E., Piga A. & Hoffbrand A.V. (1985) The role of iron in myeloid growth and differentiation. Experimental Hematology 13, 449 (Abstract 301). Encontra-se em fase de redacção a forma completa deste trabalho, a qual será brevemente submetida para publicação.

Nos trabalhos em que fui segundo autor, participei na parte experimental, nomeadamente na cultura de células e análise da diferenciação, e na discussão de resultados e colaborei na redacção dos textos.

Nos trabalhos em que fui primeiro autor, competiu-me idealizar e planificar as experiências, realizar grande parte do trabalho experimental, colher e analisar os dados e redigir os textos.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a manutenção de qualquer neoplasia pressupõem dois distúrbios fundamentais: a "imortalidade" e autonomia do processo proliferativo que mantem um crescimento celular contínuo, indiferente às necessidades do organismo e insubmisso às regras de co-habitação; e a ausência (ou deficiência) de diferenciação das células malignas que, impedindo-as de chegar ao estadio de células maduras funcionais, as torna mais ou menos inúteis, pior que isso ocupadoras e parasitárias do espaço fisiológico.

Da verificação da existência destes dois distúrbios, surgiu a interrogação que há longos anos ocupa a mente de milhares de cientistas por esse mundo fora: o que é que faz a célula neoplásica primitiva comportar-se dessa maneira? Qual é (quais são) a(s) anormalidade(s) da célula inicial ou do organismo que permite(m) que essa célula se vá dividindo, aparentemente sem controlo e sem limite, sem contribuir com a sua quota parte de função útil e jamais evoluindo para a senescência como a sua equivalente normal.

Foi quase sempre tentação dos investigadores do cancro considerar a maldiferenciação (quantitativa ou qualitativa) como defeito secundário, e mesmo possivelmente desligado do defeito proliferativo. Aquilo que sempre se configurou como essencial foi o tumor, essa massa celular de crescimento incontrolado, do qual não se espera à partida qualquer "lógica" a não ser a tumorocêntrica que conduz, como consequência última, à agressão do organismo hospedeiro e à sua morte.

Nas neoplasias hematológicas nem sempre as coisas se passam assim. Em primeiro lugar, nas leucemias agudas a anormalidade que geralmente causa a morte do doente é a diminuição acentuada de células funcionais, causada embora pela ocupação do espaço hemopoiético normal. Depois, há frequentemente efeitos sistémicos (depressão da imunidade, alterações de função de outros orgãos, a própria inibição de crescimento das células normais) que dificilmente podem ser explicados somente pelo crescimento tumoral. E por último e talvez mais importante, há doenças malignas em que os problemas de maldiferenciação quantitativa (e tudo o indica qualitativa) antecedem em muito o desenvolvimento de tumor aparente (ex. síndromes mielodisplásicos) e há tumores que se comportam durante longo tempo como tecido (aproximadamente) normal (caso da leucemia mieloide crónica).

Há muitos milhões de anos atrás as condições climatéricas, a humidade, a atmosfera

azotada e a riqueza em dióxido de carbono à face do planeta propiciaram o aparecimento das primeiras formas de vida. Estas ocorreram provavelmente no contexto de múltiplas agregações ao acaso de bases e nucleotídeos rudimentares que nalguns casos formaram estruturas precursoras dos actuais ácidos nucleicos (mais provavelmente ARN) as quais, ao serem ocasionalmente rodeadas por membranas lipídicas, assumiram individualidade. Processos autocatalíticos que ainda hoje ocorrem, mas cuja velocidade e frequência poderão ter estado aumentados devido à permissibilidade do meio, e principalmente o Tempo, esse rolar silencioso de milhões de anos, terão sido os maiores aliados do aparecimento das primeiras células.

Aí começou o gigantesco processo selectivo que conduziu às formas de vida actuais. A maior ou menor aptidão em gerar energia e adquirir novos constituintes leva à formação de novas estruturas mais completas e mais complexas, permitindo à célula mover-se, alimentar-se, defender-se, crescer. Em suma, autoriza a sobrevivência através da adequação.

Não se sabe exactamente como e quando esta individualidade, a célula, começa a duplicar o seu ácido nucleico, dividindo-se, proliferando, tornando-se imortal. Mas a Natureza é económica, ainda que nem sempre o aparente, e a lógica interna dos seus fenómenos traduz-se frequentemente no aparecimento de formas superiores mesmo que isso acarrete processos biológicos mais complicados. Há assim células que aprendem a viver em conjunto, especializando-se em diferentes funções e daí extraindo um trabalho útil para todas. Mas o aparecimento de organismos multicelulares tem importantes implicações: a subordinação ao todo causa a perda da individualidade e, mais grave, da imortalidade da célula.

Será que a célula leucémica possui as sementes do primitivismo, recusa a submissão, as regras e a morte e tenta regressar às origens protozoárias?

Desde os princípios da Hematologia que através da observação da célula leucémica, se procurou encontrar e categorizar diferenças qualitativas em relação à célula normal. Primeiro a microscopia de luz e a citoquímica e posteriormente a citogenética, a observação ultrastrutural e o reconhecimento de antigénios celulares buscaram sinais visíveis daquilo que faltava ou era excedentário na célula neoplásica traduzindo alterações mais profundas a nível genético e molecular. Paralelamente, o advento da biologia celular trouxe consigo uma metodologia que permitiu, através de modelos dinâmicos de crescimento celular *in vitro*, observar alterações comportamentais da célula leucémica e induzir experimentalmente, nesta ou na célula normal, reacções que fizessem luz sobre as modificações funcionais que presidem à origem e manutenção do processo leucémico e de algum modo esclarecessem os defeitos estruturais que lhe são subjacentes.

O sistema hemopoiético é um sistema em permanente renovação. O eritrócito,

como célula anucleada, exaure ao fim de 90-120 dias a capacidade energética e enzimática que permite manter a sua membrana deformável e a hemoglobina conformacionalmente flexível, resistindo ao atrito mecânico e às pressões oxidantes do meio. Pode-se facilmente calcular que cerca de $2x10^{11}$ novos eritrócitos têm de ser produzidos diariamente para manter a capacidade de transporte de O_2 em níveis fisiológicos. Muito menor sobrevida têm o neutrófilo (6-7 horas) e a plaqueta (8-12 dias) e, apesar de circularem no sangue em números consideravelmente inferiores ao dos eritrócitos, provavelmente a sua produção diária é equivalente ou mesmo superior.

Isto implica para o sistema hemopoiético um "turnover" muito alto, o qual tem de ser assegurado por células precursoras, já que as células maduras circulantes (à excepção do monócito e dos linfócitos) não têm capacidade reprodutora. Uma variedade de precursores, identificáveis desde o advento da microscopia, levou a suposições e teorias. Mas só desde há 20 ou 30 anos se pode demonstrar que essas células descendiam de progenitores ancestrais, comuns a muitas delas. Assim se estabeleceu em bases seguras o conceito de "stem cell" ou célula-mãe.

Em 1961, Till e McCulloch observaram que se injectassem, num ratinho letalmente irradiado, células de medula óssea de outro ratinho e se passados 7 dias lhe extraissem o baço, este continha grandes colónias,[1] nas quais era possível reconhecer células das várias linhagens hemopoiéticas em diversos estadios de maturação.[2,3] Mais do que isso, essas colónias continham células que, se retransplantadas, iriam dar origem a novas colónias no novo recipiente.[4] Cada uma destas colónias era derivada de uma única célula, denominada CFU-S ("Colony-forming unit - Spleen") como se provou por estudos com marcadores cromossómicos. [5,6]

Daqui surge o conceito de "stem cell", definido por 2 propriedades: pluripotencialidade, ou a capacidade de dar origem às várias linhas hemopoiéticas e possivelmente linfopoiéticas; [7] e auto-renovação, ou a possibilidade de dividindo-se dar origem a duas células-filhas, em tudo semelhantes a si própria. Assim a "stem cell" perpetua-se, dentro dos limites temporais do organismo, de modo a poder assegurar a hemopoiese durante toda a vida.

Segundo Till et al, a escolha entre proliferação e diferenciação seria estocástica, governada por um sistema definido de probabilidades.[8] Auto-renovação e diferenciação coexistem em equilíbrio de modo a garantir que o lugar de cada "stem cell" que vai formar uma progenia madura é preenchido por outra, mantendo as dimensões do "pool" primitivo. Assim pode afirmar-se que a probabilidade de auto-renovação num estado de equilíbrio ("steady state") é de p=0.5. No entanto, esta probabilidade pode ser alterada conforme as necessidades do organismo, podendo aumentar muito no caso de lesão do compartimento de "stem cells" de modo a que sejam substituídas as células destruidas.[9,10] Inversamente, se a solicitação de células maduras estiver aumentada, a probabilidade

de auto-renovação pode temporariamente diminuir.

Uma "stem cell" não só é capaz de se auto-perpetuar mas também pode recircular, repopulando zonas hemopoiéticas que tenham sido esvaziadas de "stem cells".[11-14]

Sendo uma população minoritária, a caracterização morfológica das CFU-S tem-se revelado impossível. No entanto, conhecem-se algumas das suas propriedades. Sabe-se que as CFU-S têm uma densidade baixa[15] e que apenas uma pequena proporção se encontra em ciclo. Pela técnica do "suicídio pela timidina tritiada ou pela hidroxiureia", verificou-se que, em condições normais, menos de 10% se encontravam em fase S,[16,17] podendo no entanto esta percentagem subir até aos 40-50% em estados de recuperação, como por exemplo pós-irradiação.[18] A CFU-S é também bastante radiossensível (Do (1) na região dos 100 rad) e a exposição a radiação crónica tem efeitos cumulativos.[19]

A imortalidade da "stem cell" é possivelmente protegida por espaços anatómicos ou funcionais denominados "nichos" por Schofield[20] que a preservariam de influências maturativas. Estas estruturas farão provavelmente parte do microambiente hemopoiético.

Os sucedâneos da "stem cell" são progenitores que, embora mantendo uma ampla capacidade proliferativa, deixam de ser pluripotenciais, isto é, vão sendo progressivamente restringidos a uma ou mais linhas. Em 1965, Pluznik e Sachs e em 1966, Bradley e Metcalf descreveram sistemas que permitiam a formação de colónias de granulócitos e/ou macrófagos *in vitro* a partir de medula óssea de ratinho.[21,22] Em 1970, Pike e Robinson conseguiram fazer crescer colónias granulomonocíticas de medula humana usando uma técnica de dupla camada em que as células da camada superior ou camada-alvo eram estimuladas por factores solúveis produzidos na camada inferior ou alimentadora.[23] Estas colónias (constituídas por um número de células que vai de 40 a mais de 200) descendem de uma única célula,[24,25] chamada célula (ou unidade) formadora de colónias de granulócitos e monócitos-macrófagos (CFC-GM ou CFU-GM, "Colony forming cell or unit-granulocyte macrophage"). As culturas contêm ainda "clusters" (de 2 a 39 células) em número 5 a 10 vezes maior que as colónias (20 a 150 CFC-GM/10^5 células medulares e 1-10 CFC-GM/10^5 células de sangue periférico.[26,27] Após quimioterapia observa-se paradoxalmente aumento de CFC-GM no sangue periférico, o que se pode dever a mobilização e recirculação de progenitores.[27]

A CFC-GM é uma célula não aderente, com uma densidade aproximada de 1.060 $g.cm^{-3}$ em gradientes contínuos de albumina ou Ficoll-Hypaque,[28-31] a qual aumenta progressivamente à medida que este progenitor se vai diferenciando em precursores mais maduros e com potencial mais restrito.[29,30,32] Cerca de 20 a 40% das CFC-GM estão em fase S como foi demonstrado por técnicas de suicídio com ^{3}H-TdR ou hidroxiureia[33,34] e têm um Do de aproximadamente 130 rads.[35,36] Expressam antigénios HLA-DR,[37-39] HLA-ABC e I/i e receptores para a transferrina,[40] mas não têm receptores para Fc ou C3.[41,42] Embora a dificuldade de purificação não permita a sua identificação morfológica, estudos morfológicos de fracções relativamente purificadas sugerem

(1) dose de radiação necessária para matar 37% das células.

elevada correlação da CFC-GM com uma célula com a aparência de linfócito "transicional" com citoplasma hiperbasófilo e 1-4 grânulos azurofílicos.[31]

Seguidamente surgiram sistemas para cultura de progenitores eritroides precoces (BFU-E, "burst forming unit-erythroid") e tardios (CFU-E, "colony forming unit-erythroid"),[43-45] megacariocíticos (CFU-Mk, "colony forming unit-megakaryocyte")[46-47] e multipotentes (CFU-mix ou CFU-GEMM, "colony forming unit-granulocyte erythroid megakaryocyte macrophage").[25,48] Esta última célula é capaz de dar origem a colónias de granulócitos, eritroblastos, monócitos-macrófagos e/ou megacariócitos (e em circunstâncias especiais linfócitos T) e é o antecessor dos progenitores restritos a uma ou mais linhas.[48-54] A monoclonalidade das colónias foi confirmada por experiências com células isoladas,[25] além de corroborada por evidência indirecta colhida de estudos de linearidade de formação de colónias com o número de células cultivadas,[55] de estudos cariotípicos[48] e com isoenzimas de G6PD.[56] As CFU-GEMM, dado serem uma população minoritária não podem ser caracterizadas morfologicamente com segurança, embora tentativamente lhe tenhamos atribuido[31] a aparência de células transicionais como tal definidas por Yoffey.[57] Algumas das suas propriedades físicas são conhecidas, podendo dizer-se que são células não-aderentes, "rosetas E negativas",[58] de baixa densidade "buoyant" (< 1.060 $g.cm^{-3}$),[31,59] radiossensíveis com um Do de 91 ± 7 rad,[60] expressando antigénios HLA-DR[61] e sendo reconhecidas pelos anticorpos monoclonais RFB1,[62] BI-3C5,[63,64] My10[65] e uma variedade de outros marcadores. Só uma pequena percentagem de CFU-GEMM se encontra em ciclo ($< 10\%$ de células mortas pelo suicídio com a ^{3}H-TdR ou a hidroxiureia).[59,66]. Ocorrem na medula óssea em número cerca de 10 vezes menor que as CFC-GM. No entanto, embora a CFU-GEMM seja o mais primitivo dos precursores com reconhecida capacidade de formar células hemopoiéticas, não corresponde inteiramente à definição de "stem cell" dado que a sua capacidade de auto-renovação em cultura é muito escassa.[67] Esta incapacidade pode ser inerente à célula ou ser devida a ausência nestas culturas de células e/ou factores acessórios que permitam à célula dividir-se sem se cometer à diferenciação. Mais recentemente, foi descrito outro sistema de cultura que permite a auto-renovação com formação de colónias de "stem cells", as quais retêm pluripotencialidade e capacidade de auto-renovação e têm origem provavelmente numa célula anterior à CFU-GEMM.[68,69]

O crescimento e maturação de todos estes progenitores hemopoiéticos resulta da interacção das células com os **factores de crescimento** apropriados, cada qual actuando em determinado estadio de diferenciação ou em linhagens específicas, mas podendo em certos casos sobrepor-se sinergisticamente. Na fig. 1 é feita uma tentativa de esquematização. O Multi-CSF, também denominado interleuquina 3 (IL3),[70] "burst-promoting activity" (BPA),[71] factor de crescimento da célula hemopoiética (HCGF)[72] ou factor estimulante da célula P,[73,74] estimula o crescimento de CFU-GEMM. É uma glicoproteína

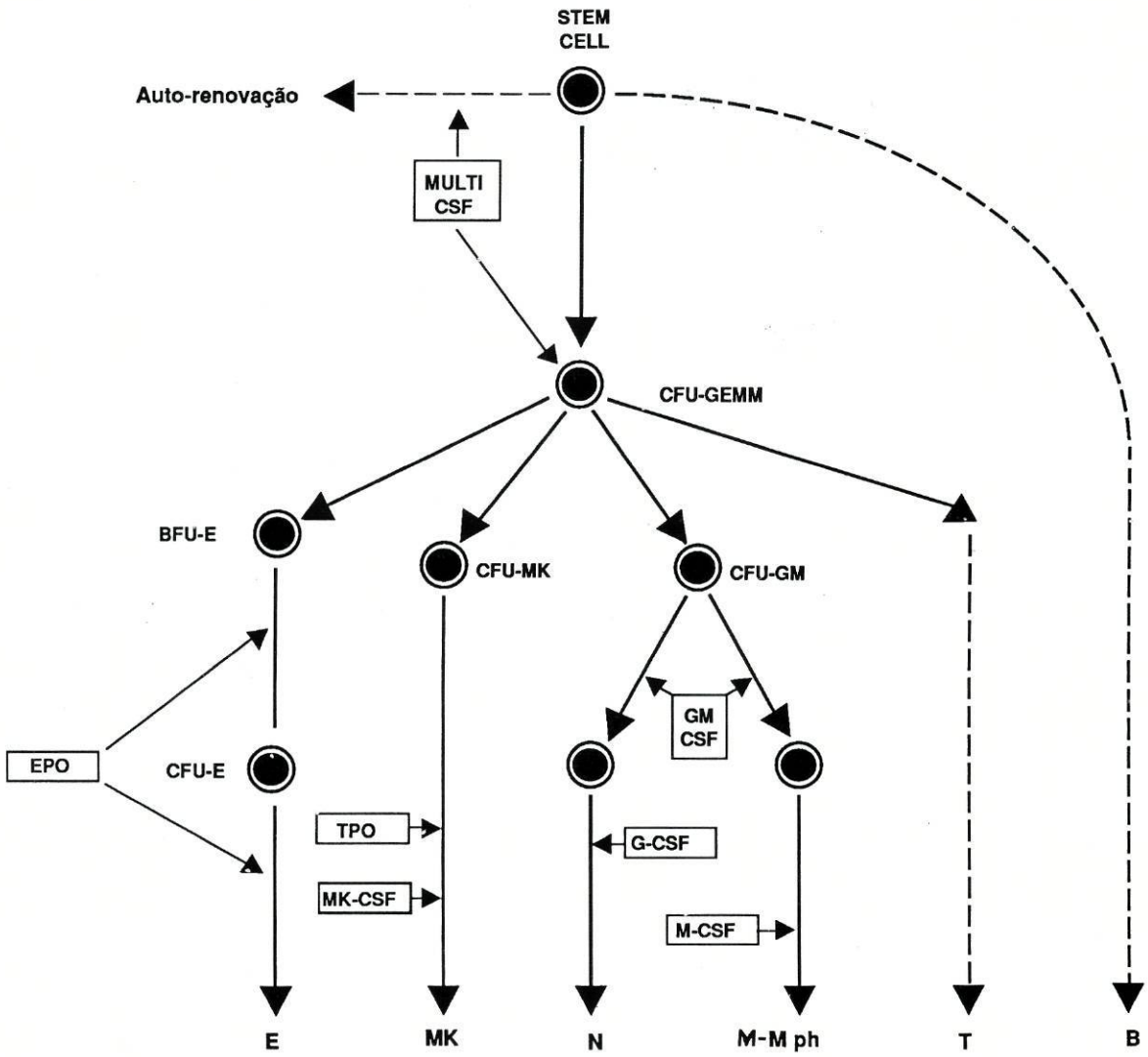


Fig. 1 - Representação esquemática da hemopoiese e dos factores de crescimento específicos de cada linhagem e estadio de diferenciação.
Sinónimos:
Multi - CSF = IL3, BPA, HCGF, PSF, Hemopoietina 2, Pluripoietina
M-CSF = CSF-1
Abreviaturas:
EPO - eritropoietina; TPO - trombopoietina; Mk-CSF - "megakaryocyte colony-stimulating factor"; E - células eritroides; Mk - megacariócitos; N - neutrófilos; M - monócitos; Mph - macrófagos; T - linfócitos T; B - linfócitos B. Para as restantes abreviaturas, ver texto.

de 23 Kd, que se pode extrair de meios condicionados de baço estimulado por lectinas (PWM-SCM, "pokeweed mitogen-stimulated spleen conditioned medium") e de leucócitos periféricos estimulados por fitohemaglutinina (PHA-LCM, "phytohaemagglutinin-stimulated leucocyte conditioned medium"), bem como de sobrenadantes de várias linhas celulares na sua maioria de linhagem T, mas com algumas excepções (WEHI-3, mielomonocítica, e 5637, carcinoma da bexiga).[75,76] É produzido por linfócitos T, mas a presença de células aderentes (monócitos-macrófagos) é aparentemente indispensável.[77-79] No homem, foi purificado até à homogeneidade com um peso molecular de 18000 dalton.[75] O Multi-CSF murino foi recentemente clonado.[80,81].

Dos factores capazes de estimular progenitores já cometidos a uma determinada linha, além da eritropoietina reconhecida há longos anos como estimulante da eritropoiese,[82,83] facto que foi confirmado *in vitro*,[43,45,84-86] existem factores específicos da linha megacariocítica (Mk-CSF e trombopoietina)[87,88] e dos granulócitos-macrófagos. Em relação a estes, há 3 factores conhecidos: 1) **GM-CSF**, "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor",[89] que estimula o crescimento de neutrófilos, monócitos-macrófagos e eosinófilos e também pode iniciar a divisão de progenitores multipotenciais, eritroides e megacariocíticos (até ao máximo de 5 divisões celulares).[90,91] O GM-CSF murino foi purificado sob a forma de uma glicoproteína de 23 Kd que, no entanto pode ser separada do Multi-CSF murino em HPLC de fase inversa.[89] O GM-CSF humano foi também purificado recentemente a partir de uma linha leucémica T, é uma glicoproteína de 22 Kd e apresenta uma homologia parcial (70%) com o murino, embora não haja reactividade cruzada.[92] Foram ambos clonados recentemente;[93-95] 2) **G-CSF**, uma cadeia polipeptídica de 25 Kd que induz a formação de colónias de neutrófilos;[96] 3) **M-CSF ou CSF-1**, um dímero de 70 Kd, capaz de estimular a formação de colónias de monócitos-macrófagos murinos.[97] Não tem equivalente humano comprovado (CSF urinário?). A estes tem possivelmente de se juntar um factor estimulante da produção de eosinófilos, Eo-CSF.[98]

Sabe-se que os factores de crescimento hemopoiéticos são não só necessários para a proliferação e diferenciação das respectivas células mas também para a sua sobrevivência em cultura.[99] As células-alvo exibem receptores para o respectivo factor de crescimento[100, 101] e a adição do factor ao meio de cultura vai ocasionar múltiplas invaginações da membrana citoplasmática ("membrane ruffling") dentro de 1 minuto e o aparecimento subsequente de vacúolos citoplasmáticos, provavelmente relacionados com a "internalização" e degradação lisossómica do factor.[102] A fixação do factor de crescimento ao seu receptor vai causar fosforilação de proteínas da membrana (1)

(1) Esta acção é semelhante às do factor de crescimento epidérmico (EGF), da insulina e do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF).[103,104] Por outro lado, esta propriedade é partilhada por 5 das proteínas putativamente transformadoras de uma família de retrovírus cujos oncogenes (src, yes, fes/fps, abl, ros) são estruturalmente relacionados (família src).[105,106]

ou do próprio receptor, como no caso do CSF-1 que se autofosforila em resíduos de tirosina. Isto despertará provavelmente mecanismos celulares que vão iniciar a síntese de ADN, aumentar a síntese proteica e diminuir a sua degradação.[107]

A homologia entre alguns factores de crescimento (PDGF) ou receptores de factores ("EGF receptor") e produtos de oncogenes como o v-sis e v-erb-B[108-111] e o facto de as proteínas para que estes oncogenes codificam terem efeitos sobreponíveis aos dos factores de crescimento[112] ou semelhante especificidade de substrato (ex. pp60v-src e quinase do "EGF receptor")[113] levantam algumas especulações sobre a presença, em neoplasias, de um mecanismo de estimulação autócrina por produtos amplificados e/ou modificados de oncogenes sujeitos a mutação ou de alguma forma desregulados ou desreprimidos.[114] A recente identificação de uma relação estrutural entre o receptor para o CSF-1 ou M-CSF e o produto do oncogene c-fms[115] vem dar força adicional a esta hipótese.

O sinergismo entre dois factores de crescimento revela-se frequentemente pela modulação, por um factor, de receptores para outro factor.[116, 117] Assim assiste-se a uma cadeia em que uma célula primitiva, induzida por um factor de crescimento a dividir-se e a diferenciar-se, vai progressivamente (sequencialmente?) exibir receptores para factores de crescimento específicos de linha. Dois modelos alternativos de cometimento (ou restricção) a uma linhagem são esboçados na fig. 2. No primeiro, o progenitor estimulado por Multi-CSF iria estocasticamente exibir um tipo de receptor que lhe permitiria responder ao estímulo de linha adequado.[118,51] No segundo modelo, a perda de potencial de diferenciação seria igualmente progressiva mas sequencial e programada geneticamente.[119-122] Em ambas estas hipóteses, estocástica a primeira, determinística a segunda, reside na "stem cell" a escolha da via a seguir. No entanto, outros autores atribuem a influências do meio (factores de crescimento, microambiente hemopoiético) a "instrução" do progenitor.[123-125]

Paralela ou concomitantemente aos factores de crescimento descritos, muitas outras substâncias existem com documentada **acção potenciadora ou inibidora** do crescimento celular *in vitro*. O soro pós-endotoxina potencia a acção do CSF,[126] provavelmente por estimulação da produção deste por células mononucleares fagocíticas.[127] Também o BCG e o C. parvum[128] e lipopolissacáridos[129] têm efeito semelhante sobre estas células. Sabe-se igualmente que eritrócitos ou hemolisados podem substituir o soro como suporte de crescimento.[130]

Por outro lado, o interferon (IFN) leucocitário humano altamente purificado inibe o crescimento de CFC-GM normais e leucémicas humanas.[131] Em muito menor escala, o mesmo acontece com IFN derivado de fibroblastos.[132] Outra linfoquina, o factor de necrose tumoral (TNF, "tumour necrosis factor"),[133] igualmente presente no soro post-endotoxina, inibe a formação de colónias, com um efeito dose-dependente, mas

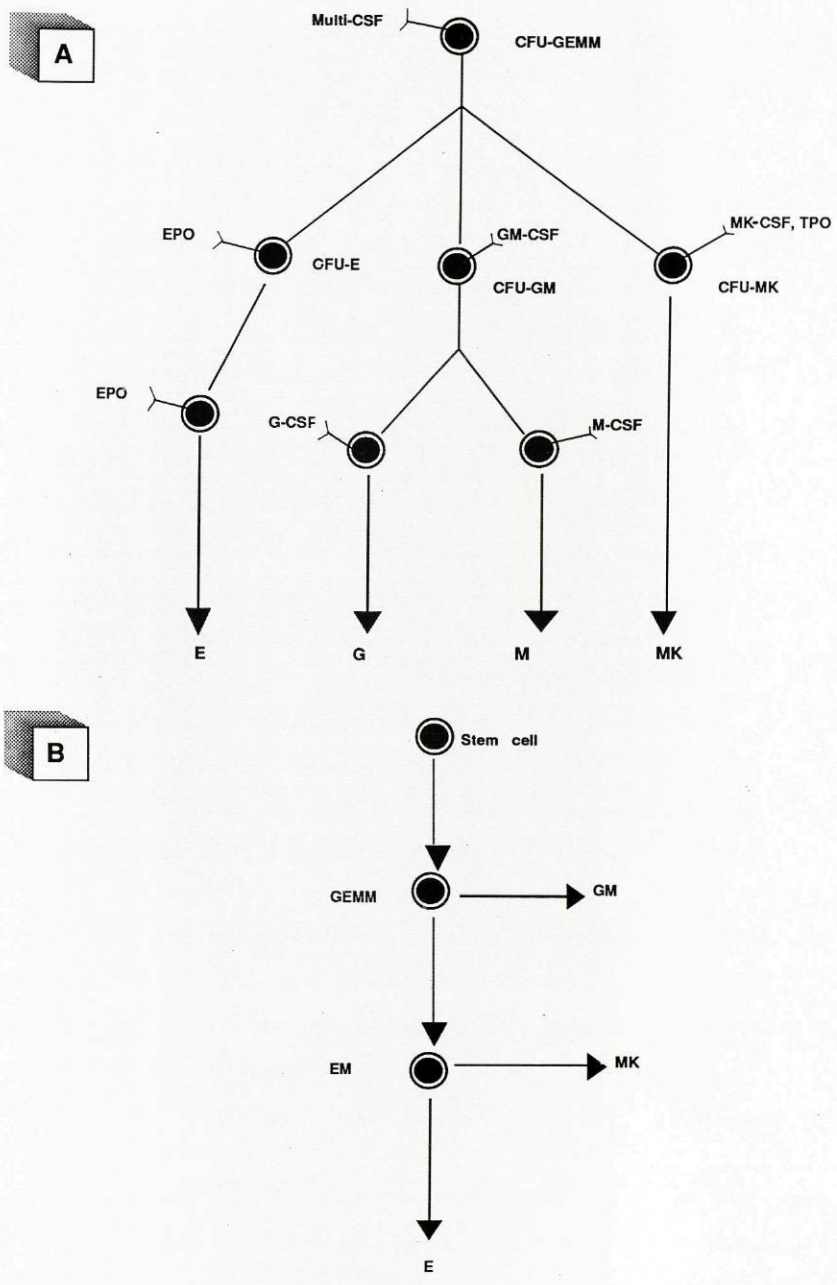


Fig. 2 - Modelos alternativos de diferenciação hemopoiética. Em qualquer dos modelos representados, a decisão sobre o cometimento a uma ou outra linha seria atributo da célula. Em (A) o progenitor estimulado por Multi-CSF iria exibir estocasticamente determinado tipo de receptor que lhe permitiria responder a um estímulo específico de linha. Com a diferenciação, a célula ia perdendo potencial de linhagem (isto é, a capacidade de dar origem ao maior número possível de linhas).[118,51] Em (B) a perda de potencial de diferenciação seria igualmente progressiva, mas sequencial e programada geneticamente. Na hierarquia da diferenciação, o cometimento à eritropoiese seria o passo final, uma vez perdidas as restantes capacidades.[119-122] Um conceito oposto defende, entretanto, que a decisão pode ser exterior à célula que veria a direcção da sua diferenciação ser determinada por influências do microambiente hemopoiético[123,125] ou de moléculas "instrutivas" (factores de crescimento, EPO).[85,124].

só em concentrações 70-100 vezes superiores àquelas com efeito anti-tumoral documentado.[128]

Também os nucleotídeos cíclicos e substâncias que interferem com o seu metabolismo têm acção sobre a proliferação celular (revisto em Friedman, 1976).[134] O aumento de AMP cíclico (cAMP) inibe a proliferação de CFC-GM, enquanto que o aumento de cGMP a activa. Idênticas acções têm, respectivamente, substâncias que inibem a fosfodiesterase do cAMP, como a teofilina, e substâncias que a activam (e inibem a fosfodiesterase do cGMP), como o imizadol.[135,136] A $PGF_{2\alpha}$ e a carbamilcolina também potenciam a acção do CSF, provavelmente por aumento da concentração intracelular de cGMP.

As prostaglandinas da série E (PGE) inibem o crescimento de CFC-GM com efeitos a concentrações de 10^{-9} a 10^{-10}M,[136,137] actuando sobre progenitores HLA-DR positivos.[138] A PGE também inibe a proliferação de linfócitos B estimulados por mitogénio[139] e da linha mielomonocítica murina WEHI-3, esta em concentrações de 10^{-10}-10^{-12}M,[136,140] mas potencia a acção da eritropoietina na incorporação de ^{59}Fe e ^{14}C-glucosamina em precursores eritroides.[141] A PGE é produzida por monócitos e macrófagos sob estimulação de CSF, o qual induz a conversão de ácido araquidónico em PGE_2 e 6-ceto-$PGF_{1\alpha}$ [142] e a sua acção inibitória é suprimida pela indometacina, conhecido inibidor da "prostaglandina sintetase".[143]

Dos neutrófilos pode igualmente extrair-se uma "actividade" inibitória do crescimento de CFC-GM que actua por inibição da produção de CSF pelos monócitos-macrófagos.[144] Esta "actividade" (1) foi isolada na forma de uma glicoproteína de peso molecular entre 80 e 100 Kd e pI entre 6.0 e 6.5[145] e posteriormente identificada como lactoferrina (LF).[146] A LF existe em grânulos nos neutrófilos maduros e tem uma conhecida acção bacteriostática, privando as bactérias de ferro necessário ao seu crescimento.[147] A LF parece actuar a muito baixas concentrações (activa a 10^{-17}M, segundo Broxmeyer) na sua forma saturada, enquanto que a apoproteína apenas é activa a altas concentrações. Na leucemia mieloide crónica (LMC) e nas doenças mieloproliferativas, bem como em leucemias agudas, existe deficiência quantitativa (e aparentemente qualitativa) de lactoferrina.[148-152]

Células de doentes leucémicos (frescas ou em cultura) e linhas celulares leucémicas produzem igualmente actividades inibitórias várias, denominadas LIA ("leukemia inhibitory activity"),[153,154] LAI ("leukemia associated inhibitor")[155] e uma "actividade" produzida pela linha JURKAT.[156] A LIA, posteriormente identificada como isoferritina acídica (IFA),[157] inibe a proliferação de CFC-GM, CFU-GEMM e BFU-E normais HLA-DR positivas,[158,159] mas não de células leucémicas.[160] A IFA é também produzida por monócitos-macrófagos.[161]

É provável que estas duas proteínas do metabolismo do ferro façam parte de um sistema de "feed-back" regulador da granulopoiese.[162]

---

(1) o termo "actividade" descreve um efeito cujo(s) agente(s) não é (são) ainda conhecido(s) ou isolado(s).

O crescimento celular *in vitro* requer ainda a presença de elementos essenciais (aminoácidos, vitaminas, minerais) e de substâncias presentes no soro (soro bovino fetal, soro humano) ou plasma (revisto em Iscove, 1984).[163] Para o crescimento de CFU-GEMM, foi demonstrado que o soro humano constituia melhor suporte de crescimento que o plasma respectivo, o que se pode dever à presença naquele de factor de crescimento derivado das plaquetas, PDGF.[164] Tentativas de isolar as substâncias que no soro (ou plasma) são essenciais ao crescimento celular, levaram à observação de que a albumina, transferrina, lisolecitina e selénio são necessidades mínimas indispensáveis em qualquer meio de cultura.[165]

A formação de colónias exige a cultura em meio semi-sólido (agar, metilcelulose, coágulo de plasma), embora haja igualmente proliferação celular em culturas líquidas (ou de suspensão). Mas nestas, a dispersão das células pelo meio não permite sugerir relações de co-filiação (revisto em Metcalf, 1977).[166]

Para se obter ambiente propício à sobrevida e proliferação, as células devem ser incubadas a temperatura aproximada de 37°C., em atmosfera saturada de humidade com concentração de CO_2 entre 5% e 7,5% que origine um valor de pH entre os limites fisiológicos. Baixas tensões de O_2 aumentam a eficiência de cultura.[167]

Vários sistemas têm sido descritos para a **colonização** específica *in vitro* de **células de leucemia aguda mieloblástica**, mas nenhum deles é perfeitamente satisfatório.[168-170] Tem sido mais frequentemente utilizada[171-176] a técnica de cultura de CFC-GM descrita por Pike e Robinson,[23] permitindo observar correlações entre o prognóstico clínico da leucemia e o padrão de crescimento *in vitro* (ausência de crescimento, crescimento com predomínio de colónias ou de "clusters")[173,174] ou a sensibilidade ao CSF.[175,176] Este sistema tem sobre os anteriores a vantagem de as células crescerem no mesmo meio e condições de estímulo das células normais, podendo assim ser avaliadas diferenças de crescimento e sensibilidade ao estímulo entre progenitores normais e leucémicos. Num e noutro dos métodos é, no entanto, muitas vezes difícil ou mesmo impossível discernir entre clones leucémicos e clones residuais de hemopoiese normal, se (e quando) ela existe.

Algumas linhas celulares leucémicas mieloides humanas foram estabelecidas ao longo dos anos (revisto em Koeffler & Golde, 1980).[177] Entre estas estão a linha eritroleucémica K562 estabelecida a partir de um doente em crise blástica de LMC,[178] HL60 (promielocítica) estabelecida a partir de um doente com leucemia promielocítica,[179] ML1,2 e 3 (mieloblásticas/promielocíticas) estabelecidas de um mesmo doente com leucemia aguda mieloblástica,[180] KG1 uma linha mieloblástica ou indiferenciada (KG1a) mas estabelecida a partir de um doente com eritroleucemia[181] e ainda as linhas mielomonocítica HL92,[182] monocíticas U937[183] e THP-1[184] e eritroblástica HEL.[185] No caso de se querer avaliar a acção de um composto, as linhas celulares estabelecidas têm sobre a cultura de células leucémicas *ex vivo* as vantagens da padronização e não compli-

cação da análise dos resultados pela presença de componentes celulares normais. No entanto, a cultura de células primárias de doentes leucémicos é utilizada sempre que se pretendem estudar variações individuais de comportamento[173-176,186] ou a interrelação entre células leucémicas e normais.[187] As linhas celulares leucémicas apresentam ainda frequentemente o problema de alteração das suas características ou emergência de sublinhas, devido às múltiplas passagens em laboratório ou a transformação acidental por agentes etiotrópicos, como vírus (sendo o mais comum o EBV devido possivelmente à sua ubiquidade).

O problema da **diferenciação de células leucémicas** em cultura começou a ser equacionado posteriormente ao da proliferação.[188-190] Cedo se sugeriu que a indução de diferenciação de uma população celular leucémica (murina) *in vitro* se correlaciona directamente com perda de leucemogenicidade.[189] No entanto, o trabalho pioneiro de Leo Sachs (revisto em Sachs, 1978 e 1986),[191,192] por umas razões ou por outras, só lentamente veio a ter repercussão. Este trabalho assenta num certo número de conceitos, alguns deles ainda controversos. Sachs e col. defendem que a proliferação e a diferenciação celulares no sistema mieloide são estimuladas por factores diferentes.[193-195] A diferenciação normal seria estimulada por um factor fisiológico indutor da diferenciação (MGI-2;[193,195] DIF;[196] ou D factor;[189,197]), produzido pelas células precursoras quando estimuladas pelo factor de crescimento (MGI-1 ou CSF).[198] Este factor tinha especificidade de linhagem e ligava-se ao ADN, ao contrário do factor indutor da proliferação;[199,200] era capaz de induzir a diferenciação de células leucémicas murinas[195] e humanas[196,201] e distinguia-se, pelo menos parcialmente do CSF.[197,202,203] Esta interpretação é ainda hoje discutível dado ter-se constatado que factores de crescimento altamente purificados (G-CSF) têm por si actividade diferenciante[96,204,205] e que um DIF ("differentiation-inducing factor") de baixo peso molecular (25Kd), produzido por células mononucleares periféricas estimuladas por mitogénio, co-cromatografa com o CSF.[196] No entanto, um DIF altamente purificado a partir do sobrenadante da linha leucémica T, HUT-102, não contem CSF detectável, tendo características bioquímicas semelhantes à forma de DIF de mais alto peso molecular (40Kd) produzida por células mononucleares estimuladas.[206] Ainda segundo Sachs e col., a ausência de emparelhamento entre proliferação e diferenciação (por interrupção a qualquer nível do mecanismo: estimulação da proliferação → produção de factor diferenciante → estimulação da diferenciação) seria uma das alterações genéticas responsáveis pelo comportamento leucémico,[207] sendo a outra a redução ou eliminação da necessidade de uma fonte externa de CSF (por simples diminuição da necessidade ou por produção autónoma de factor de crescimento pelas células leucémicas).[191,192] As células leucémicas podem ser induzidas a diferenciar-se,[188,189,196,201,208-214] isto é, a expressar características morfológicas, citoquímicas, antigénicas e funcionais de células maduras terminais (embora

por vezes parcialmente deficientes[215-217]), e a parar de crescer,[189,208,210,218] por acção de uma variedade grande de compostos, quer fisiológicos quer farmacológicos. Entre as características de maturidade que permitem distinguir uma célula leucémica diferenciada de uma não induzida ou incapaz de se diferenciar contam-se (embora nem todas estas características sejam necessáriamente expressas pelas células induzidas): aparência de neutrófilo ou macrófago maduro; aderência ao plástico; positividade esterásica específica ou inespecífica; positividade peroxidásica (quando não expressa anteriormente); síntese de hemoglobina (em eritroleucemias); capacidade de produção de superóxido; resposta a estímulos quimiotáxicos; capacidade fagocítica; expressão de receptores para Fc e C3b; produção de lisozima; reactividade com anticorpos monoclonais que reconhecem antigénios de membrana característicos de células maduras; e perda de potencial proliferativo.

O tipo de diferenciação susceptível de ser induzido pode variar não só com a estirpe celular em causa mas também com o indutor utilizado, favorecendo uns a diferenciação granulocítica (ácido retinoico;[211] ácido butírico, DMSO e dimetilformamida;[210,219] hipoxantina, actinomicina D e hexametileno-bisacetamida;[212] 3-deazauridina[220]) e outros a diferenciação monocítica das células leucémicas (forbol ésteres;[201,221] DIF;[196] Vit. D3[222-224]).

É reconhecido que o defeito primário das doenças malignas hemopoiéticas reside na célula e não no meio extracelular (embora este possa de algum modo ser permissivo ou hostil). Esta premissa baseia-se na verificação da monoclonalidade das leucemias, pressupondo a filiação do processo numa só célula doente inicial,[225-229] na observação de alterações comportamentais, genéticas e bioquímicas que as células leucémicas exibem mesmo quando fora do organismo hospedeiro e na recriação, por enxerto, da doença em gerações sucessivas de animais de experiência. Mas o defeito intracelular pode assumir diversas formas e desconhece-se ainda se só um ou mais defeitos concorrem para a transformação leucémica. A inconstância da natureza do defeito através do largo espectro de tipos leucémicos e ao longo da própria história natural da doença levou a postular bloqueios de maturação a diferentes níveis,[230,231] cada qual condicionado por determinada alteração estrutural. Por vezes, a evolução da doença permite observar "saltos qualitativos", encadeados em sucessão altamente probabilística, determinando passos significativos na sua progressão. Isto é particularmente visível em neoplasias hemopoiéticas de curso inicial arrastado (ex. síndromes mielodisplásicos e mieloproliferativos), as quais desaguam inevitavelmente num processo agudo. No entanto, a noção de "bloqueio" enquanto constrangimento absoluto, parece ser demasiado simplista e não explica a frequente heterogeneidade da população maligna.

O(s) distúrbio(s) da célula neoplásica pode(m) situar-se a diversos níveis de gestão da célula ou do seu diálogo com o meio. Receptores de membrana traduzem "informação"

circulante ou simplesmente facultam o acesso à célula a outras moléculas; a própria bi-camada lipídica é permeável a elementos e pequenos compostos orgânicos, num fluxo altamente regulável. Alterações desta área "envenenam" a relação da célula com tudo aquilo que a circunda. Peças doentes da maquinaria celular podem conduzir a que o sinal externo seja defeituosamente processado, amplificado ou suprimido. Interferências nos canais de comunicação que ligam a periferia ao núcleo podem levar a que um dado estímulo se perca ou esterilize. O processo mitótico e os seus comandos estão sujeitos a desregulação que lhe altere o ritmo e a iniciação. Genes mutantes podem inaugurar todo um ciclo de aberrações. E a sincronia do núcleo, com a expressão sequencial e cadenciada dos seus genes, pode estar perturbada. Informação genética importante é erroneamente transcrita, suprimida ou extemporaneamente expressa; genes normalmente silenciosos são desreprimidos, dando origem à síntese de proteínas "excitativas" ou "provocativas".

Muitas questões estão ainda por resolver em relação à diferenciação hemopoiética normal e aos distúrbios fundamentais que levam à maldiferenciação leucémica, a tal ponto que não podem ser objecto de um só estudo. Este estudo pretende, modestamente, aflorar algumas destas questões, de um ponto de vista supramolecular mas dinâmico.

Qual é a exacta relação entre factores de crescimento e diferenciação? Se o cometimento à diferenciação é um acontecimento probabilístico, será ele susceptível de ser influenciado por circunstâncias externas? E quais? Que variações individuais podemos esperar de células leucémicas de diferentes doentes e o que é que concorre para isso? Qual é o desarranjo fundamental que impede estas células de seguirem o seu normal programa de diferenciação? E qual a interrelação entre os processos proliferativo e maturativo?

A indução da diferenciação terminal de células leucémicas indiferenciadas (ou incompletamente diferenciadas) é uma razoável aproximação ao estudo dos processos biológicos envolvidos na diferenciação normal. Assim como a modulação da capacidade diferenciante de células com propriedades normais, seja no sentido de imitar vagamente o comportamento leucémico seja na direcção oposta, pode fornecer indicações valiosas sobre limites extremos da elasticidade fisiológica (tantas vezes próximos da patologia) e dos factores que a condicionam.

Não há razões para pensar que o estado patológico não possui também uma maleabilidade própria. Mas qual é a fronteira?

No presente estudo foram usadas técnicas de cultura (semi-sólidas e de suspensão) para progenitores granulomonocíticos e propagação em meio líquido de linhas celulares leucémicas. A avaliação da diferenciação celular teve como base a apreciação morfológica e citoquímica, a expressão de características funcionais e a perda de potencial proliferativo. O acesso a parâmetros morfológicos e citoquímicos nas culturas de agar foi

possível através da paciente adaptação de técnicas correntes à coloração de clones *in situ*[30,54,232] em que o gel era transferido para uma lâmina numa modificação do método descrito por Jacobs et al.[233] No decurso do estudo, foi-se lançando mão de outras técnicas (adaptando-as sempre que necessário) e estas incluiram técnicas imunológicas (imunofluorescência, citotoxicidade, imunoprecipitação), radioisotópicas (incorporação e suicídio de ^{3}H-TdR), citofluorométricas (fluorescência do ADN) e de detecção bioquímica (redução do nitroazultetrazólio, NAT), entre outras.

Com este estudo tentou-se responder a algumas das questões que se levantam sobre o equilíbrio proliferação/diferenciação no sistema mieloide. Nomeadamente procurou-se:

1) Avaliar o efeito diferenciante da actividade (1) estimulante de colónias - GM (GM-CSA) e estabelecer as características da resposta para células normais, se possível materializando-a numa curva dose-resposta;

2) Avaliar as características do efeito diferenciante de GM-CSA conforme as subpopulações envolvidas na sua produção (eliminando selectivamente várias subpopulações de linfócitos T);

3) Avaliar o efeito diferenciante de CSA em células de doentes leucémicos, tentando estabelecer as características da resposta. A possibilidade de esta resposta ser linear (ou de se poder linearizar por meio de uma transformação) permitiria a obtenção de curvas dose-resposta, facultando a comparação da resposta dos diferentes doentes e permitindo relacioná-la com a evolução da doença;

4) Analisar a relação entre proliferação e diferenciação em células leucémicas daí extraindo princípios gerais sobre o equilíbrio proliferação/diferenciação na leucemia aguda mieloblástica;

5) Tentar detectar a presença de factor(es) diferenciante(s) endógeno(s) e estabelecer as suas características;

6) Estudar os mecanismos envolvidos na diferenciação granulomonocítica normal e na indução da diferenciação de células mieloides leucémicas e daí inferir conclusões sobre as possíveis alterações do mecanismo normal de diferenciação celular.

Para a prossecução deste último objectivo, testaram-se combinações de vários agentes indutores pesquisando possíveis interacções que sugerissem mecanismos de actuação.

---

(1) usar-se-á o termo actividade em vez de factor sempre que se lidar com produto não purificado.

A IFA, identificada como actividade leucémica inibidora da granulopoiese normal, actuando sobre progenitores em fase S, e implicada como possível regulador de feed-back da hemopoiese, foi seguidamente testada para actividade diferenciante em células normais.

Finalmente, tentou-se estudar o papel que o ferro tem na proliferação e diferenciação de células normais e leucémicas (de linhas celulares estabelecidas), usando um quelante do ferro, a desferrioxamina, e um anticorpo que inibe a ligação da transferrina saturada ao seu receptor e consequentemente a "internalização" de ferro.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) OBTENÇÃO DE CÉLULAS PARA CULTURA

a) **Medula óssea normal**

Colhida no Royal Free Hospital de dadores adultos normais voluntários após informação acerca do procedimento e consentimento do dador. As regras para a obtenção de medula de dadores normais tinham sido previamente apreciadas e aprovadas pelo Comité de Ética Médica do Royal Free Hospital and School of Medicine.

b) **Doentes com Leucemia mieloide crónica**

Sangue periférico colhido, no Royal Free Hospital ou no Hammersmith Hospital (cortesia do Dr. John Goldman), por citaférese terapêutica de doentes com Leucemia mieloide crónica (LMC). Posteriormente, a fracção mononuclear (< 1.077 g.cm^{-3}) era separada num gradiente de Ficoll-Hypaque, depletada de células aderentes (ver abaixo em "Preparação de células") e criopreservada a -196°C. em N_2 líquido, depois de dividida em alíquotas de aproximadamente 2 ml contendo 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) em meio de cultura (McCoy's 5A suplementado com soro bovino fetal). Para o arrefecimento utilizou-se um congelador de células Planar programado para descida gradual de 1°C./min entre +4°C. e -70°C. e 5°C./min abaixo dessa temperatura.

A recuperação das células fazia-se por aquecimento rápido em banho de 37°C., seguido de diluição lenta (quando se iniciava a passagem à fase líquida) em solução de meio de cultura contendo heparina sem conservante e DNAse (2.5 U/ml), previamente arrefecida a +4°C.

c) **Doentes com Leucemia aguda mieloblástica**

A medula óssea (nalguns casos sangue periférico) dos doentes cujos dados clínicos são sumarizados no Quadro I, foi colhida como parte do procedimento diagnóstico, no Departamento de Hematologia do Royal Free Hospital.

d) **Doentes com Síndrome mielodisplásico**

Medula óssea colhida, para diagnóstico ou reavaliação, no Royal Free Hospital e Royal Victoria Hospital (Bournemouth).

e) **Sangue periférico normal**

Utilizado na preparação das camadas nutritivas que fornecem o estímulo para a proliferação (e diferenciação) dos progenitores mieloides. Colhido de dadores normais e de doentes sujeitos a testes laboratoriais no Departamento de Hematologia do R.F.H.. Foram excluídos doentes com patologia hemolinfopoiética ou sujeitos a terapêutica citotóxica ou antibiótica.

2) PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS

a) **Sangue periférico para camadas nutritivas**

Entre 10 a 20 ml de sangue eram colhidos assepticamente para tubos Sterilin Universal esterilizados onde previamente se tinham depositado 0.3 ml de heparina e 2 ml de dextrano. O sangue era deixado a sedimentar à temperatura ambiente, colhendo-se a intervalos o sobrenadante rico em leucócitos, tentando evitar a contaminação com glóbulos rubros. As células eram contadas num aparelho Coulter e a sua concentração ajustada a $2x10^6.ml^{-1}$, por diluição em McCoy's 5A suplementado com soro bovino fetal (SBF).

Nas experiências em que se pretendia estudar a resposta de progenitores mieloides a diferentes concentrações de GM-CSF, as células do sobrenadante eram ainda sujeitas a separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (ver abaixo) de modo a isolar a fracção mononuclear responsável pela produção de CSF. Estas células mononucleares eram então diluidas seriadamente, sendo incorporadas na camada nutritiva nas concentrações especificadas no capítulo de RESULTADOS. Evitava-se assim a contaminação por polimorfonucleares a qual complicaria a análise de resultados.

b) **Medula óssea**

Cerca de 10 ml de medula eram colhidos assepticamente para um tubo Sterilin Universal onde se colocavam previamente 2 ml de meio de cultura com heparina e dextrano. O tubo era colocado na incubadora de CO_2 e quando se dava a sedimentação dos eritrócitos, recuperava-se o sobrenadante rico em células brancas e precursores. Tentava-se quebrar exaustivamente os fragmentos de medula através de aspiração e expulsão com uma seringa munida de agulha de diâmetro fino. Os fragmentos que se não desfizessem com esta manobra eram eliminados por filtração (filter needle "Monoject 16 gauge"), de modo a evitar causas de erro.

Nalgumas experiências, utilizaram-se células do sobrenadante mas na maioria delas usaram-se células mononucleares e por vezes depletadas de células aderentes.

c) **Separação de células mononucleares**

As células do sobrenadante eram diluídas 1:3 em meio de cultura contendo heparina e esta solução era suavemente suspendida, sem misturar, no topo de 6 ml de Ficoll ("Lymphocyte Separation Medium", Flow Lab. Ltd, U.K.) de densidade 1.077 $g.cm^{-3}$, até perfazer o volume de 25-30 ml. O gradiente era centrifugado durante 30 min a 400 g e no fim colhia-se a interface constituida por células mononucleares. As células eram posteriormente lavadas em meio de cultura contendo heparina.

Nalgumas experiências praticou-se um corte de densidade a 1.063 $g.cm^{-3}$ que permite maior purificação de progenitores,[31] usando um meio obtido pela mistura de Triosil-Ficoll e Krebs-Ringer-Tris. O procedimento é em tudo semelhante ao anterior.

d) **Depleção de células aderentes**

Feita pelo método de Messner et al.[234] As células mononucleares eram suspensas em meio de cultura na concentração de $2x10^6.ml^{-1}$ e 10 ml desta solução dispensados em discos de Petri plásticos grandes, deixando-se incubar a 37°C. durante 60 min em atmosfera de CO_2. No fim da incubação, o sobrenadante era retirado, agitando-se suavemente os discos de modo a que só as células firmemente aderentes restassem no disco.

3) MÉTODOS DE CULTURA

a) **Culturas em meio semi-sólido (agar)**

- **Dupla camada** (técnica de Pike e Robinson)[23]

Nesta técnica, $1x10^6$ leucócitos de sangue periférico, imobilizados numa camada de 0.5% agar (camada nutritiva), produzem GM-CSF suficiente para estimular maximamente os progenitores mieloides incorporados numa camada superior (camada-alvo) de 0.3% agar.

Os leucócitos preparados do modo acima descrito eram diluídos em McCoy's 5A (Flow Lab) suplementado com 15% soro bovino fetal (várias proveniências, sendo de cada vez seleccionado o lote que oferecia melhor suporte de crescimento em cultura, com menor actividade estimulante intrínseca), 10^4 Un de Penicilina/Estreptomicina e L-glutamina (200 mmol). Ajustava-se a concentração a $2x10^6$ células . ml^{-1} e juntava-se em partes iguais a 1% agar diluido (depois de previamente aquecido até à sua fusão) no mesmo meio de cultura. A mistura era rapidamente distribuida em discos de Petri plásticos de 35 mm de diâmetro, em quantidades de 1 ml, de modo a recobrir toda a superfície do disco e deixada a gelificar. Os discos assim preparados podiam ser conservados durante 7 dias na incubadora de CO_2, tempo durante o qual se mantem a sua capacidade de estimular os progenitores mieloides. Quando se pretendia experimentar a acção de drogas sobre progenitores mieloides, e dado que há a possibilidade de aquelas difundirem da camada superior para a camada nutritiva e assim interactuarem com as células produtoras de CSF, utilizaram-se camadas nutritivas com pelo menos 3 dias, de modo a permitir a formação normal de GM-CSF durante esse período.

Na camada superior, as células-alvo que incluem as CFC-GM eram diluídas no mesmo meio de cultura e analogamente misturadas com 0.6% agar de modo a dar a concentração pretendida de células (variável com o fim em vista mas mais frequentemente $1x10^5.ml^{-1}$) e agar. Esta mistura era colocada, em volumes de 1 ml, nos discos previamente recobertos com uma camada nutritiva.

As culturas eram incubadas a 37° C. em 5% CO_2 em ar, num ambiente saturado de humidade. O período de cultura variava de acordo com o fim pretendido, sendo a contagem do número de CFC-GM feita sistematicamente ao fim de 7 dias de incubação.

- **Camada única**

Nesta técnica, usada em muitas experiências, prescinde-se da camada nutritiva, dado se dispôr de meio condicionado contendo CSF. É este o caso do 5637CM, meio condicionado por uma linha celular de carcinoma da bexiga,[235,236] oferta amável de H.E.Broxmeyer, e do PHA-LCM, um meio condicionado por leucócitos periféricos cultiva-

dos na presença de fitohemaglutinina.[237] Curvas de dose-resposta estabeleceram como concentrações capazes de estimulação máxima: entre 5% e 10% (5637CM) e 2.5%-5% (PHA-LCM), variando com os lotes - ver em RESULTADOS.

Uma camada única de 0.3% agar era preparada de modo semelhante ao descrito para a técnica da dupla camada (camada superior), incorporando as células-alvo de medula óssea e a concentração relevante do estimulante. A mistura era colocada em discos de Petri com bordos arredondados ("Lux Contour dishes"), para evitar a formação de menisco.

b) **Culturas de suspensão**

As culturas de suspensão permitem o estudo mais fácil das células-filhas, facilmente recuperáveis por centrifugação e lavagem, embora não permitam a apreciação da sua interrelação como nos "assays" clonogénicos (isto é, estabelecer qual é a progenia de uma dada célula-mãe).

Nalgumas experiências, geralmente complementares das dos "assays" clonogénicos, utilizaram-se culturas de suspensão. Nestas, as células-alvo são suspensas em meio de cultura (em tudo análogo ao anterior) e na presença de estimulante (10-20% 5637CM ou 5% PHA-LCM), em tubo ou placa "multiwell". O crescimento dá-se igualmente a 37° C. em 5% CO_2. Alíquotas de células podem ser recuperadas das culturas em qualquer ponto-tempo desejado, não perturbando o crescimento das restantes células. As células são lavadas, ressuspendidas e posteriormente cultivadas em meio semi-sólido para determinar a sua capacidade clonogénica; ou avaliados parâmetros morfológicos, citoquímicos e funcionais que classifiquem o seu grau de diferenciação.

4) CULTURA DE LINHAS CELULARES LEUCÉMICAS

Há uma variedade grande de linhas estabelecidas de leucemia mieloblástica que podem servir de modelo ao estudo da hemopoiese maligna. Propagam-se em suspensão e têm crescimento exponencial desde que mantidas entre determinadas concentrações e adequadamente alimentadas.

Foram usadas as linhas HL60[179] e ML2[180], derivadas de doentes com leucemia promielocítica, e K562,[178] derivada de um doente em crise blástica eritroleucémica de leucemia mieloide crónica. Estas linhas tinham já sido exaustivamente caracterizadas.[178-180,215]

As linhas eram mantidas em crescimento contínuo no laboratório, a partir de alíquotas criopreservadas em N_2 líquido, sendo semi-populadas com adição de meio fresco (incluindo novos constituintes) cada 2-3 dias. Em cada experiência, células em cresci-

mento exponencial eram suspensas em RPMI1640 (Flow Lab ou Gibco), suplementado com 10% soro bovino fetal inactivado pelo calor, SBF-IC (30 min a 56° C.), L-glutamina e Penicilina/Estreptomicina e ajustadas a uma concentração de $1x10^5$ células.ml^{-1}, na presença ou ausência do agente cuja acção se pretendia estudar (DFX, HU, TPA, ácido retinoico, anticorpo anti-receptor da transferrina). As células cresciam em placas "multiwell" (12 ou 24 "wells" ou "poços"). O volume cultivado variava com a superfície dos "poços" - 0.5 ml nas placas de 24 "poços" (superfície = 2 cm^2/poço); 1 ml nas placas de 12 "poços" (superfície = 3.6 cm^2/poço) - de modo a manter uma relação volume/superfície óptima para o crescimento celular. As células eram deixadas em suspensão sem realimentação até ao máximo de 7 dias, altura em que a superpopulação e a limitação de nutrientes as fazia entrar em *plateau* de crescimento e começar a degenerar. Em alternativa, praticou-se cultura em frascos, partindo de concentrações celulares mais altas, com realimentação cada 2 dias para evitar a paragem de crescimento. O meio de realimentação devia conter os compostos em teste, em concentrações iguais às iniciais.

Em diversos pontos-tempo, alíquotas de células eram retiradas da cultura de suspensão, o número de células contado num aparelho Coulter e avaliado o seu grau de diferenciação. A percentagem de células viáveis era determinada através da coloração com Azul Tripano.

5) AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO

a) **Culturas semi-sólidas (agar)**

As culturas semi-sólidas permitem a formação de colónias (≥ 40 células) ou "clusters" (2-39 células) a partir de uma só célula-mãe. A textura do gel propicia que as células-filhas se mantenham até certo ponto agrupadas, e esta disposição sugere uma relação de filiação e permite determinar o número de células cultivadas com potencial clonogénico e a extensão deste potencial. As células com capacidade de formar colónias de 40 ou mais células são denominadas Células Formadoras de Colónias (CFC ou CFU) e a todas as células capazes de formar clones chama-se células clonogénicas.

Os clones têm forma, dimensão, constituição e maturidade variáveis. A dimensão varia com o número de células componentes (de 2 a mais de 200) e pode atingir tamanho tal que permita a visualização macroscópica. Os clones podem apresentar estrutura compacta, dispersa ou mista (com centro compacto e células periféricas dispersas). No entanto um clone é sempre definido por um arranjo concêntrico, o qual permite identificá-lo. Se houver superpopulação, a identificação dos clones torna-se difícil devido à interpenetração ou sobreposição destes. A constituição dos clones é também hetero-

génea. Num sistema para a cultura de CFC-GM como o utilizado, podem coexistir clones contendo só neutrófilos (predominantes), só eosinófilos ou só monócitos-macrófagos, ou clones contendo elementos de 2 ou mais linhas em proporções variáveis.[238] Clones formados por células de 2 ou mais linhas parecem descender de células de menor densidade e que têm potencial clonogénico maior do que progenitores unipotenciais, já restringidos a uma única linha.[30] A maturidade dos clones pode igualmente variar com as condições de cultura, com a população cultivada e com o estímulo fornecido, tendo esta variação sido um dos objectos deste estudo - ver RESULTADOS. Em condições normais, existem clones contendo só células maduras, só células imaturas ou uma mistura de células maduras e imaturas (estas geralmente localizadas na parte central do clone) e as suas distribuições relativas dependem do tempo de cultura (aumento de maturidade com o tempo).

O número de clones e colónias numa dada cultura permite assim a avaliação até certo ponto correcta (dependente das condições de cultura) do número e qualidade das células clonogénicas. A contagem de clones fazia-se contando (ao microscópio) uma determinada área (geralmente 144 mm^2 em discos com a área total de 962.1 mm^2) de 3, 4 ou 5 discos por condição experimental, especificando-se se se tratava de colónias ou "clusters". O número obtido era corrigido para o número de células semeadas e expresso em colónias/10^5 células ou total de clones/10^5 células.

Nalgumas experiências, foi também contado o número de células por clone de modo a avaliar o potencial proliferativo das células clonogénicas que lhes dão origem. Este valor (tamanho do clone) é expresso em número de células por clone. Como a distribuição destes valores é não-gaussiana, teve de ser calculada a média geométrica das diversas observações.

Para avaliar a resposta de células leucémicas a diferentes concentrações de GM-CSA e a resposta de células normais a GM-GSA produzido por diferentes populações de células mononucleares selectivamente depletadas de certas subpopulações T, utilizou-se o princípio descrito por Francis et al.[239] Em resumo, o número de clones em culturas estimuladas por uma dada concentração de CSA (medida pela concentração de células na camada nutritiva) é designado Y e uma relação linear com o estímulo pode ser obtida pela transformação $_n\log (B/Y-1)$ em que B é o número de clones obtido com a estimulação máxima ($1x10^6$ células periféricas/camada nutritiva) (1). Curvas dose-resposta obtidas por esta transformação eram aproximadamente lineares quer para células normais quer para células leucémicas.[175,239]

(1) A transformação $_n\log (B/Y-1)$ é baseada na equação para a curva da função logística, usada tanto para crescimento de populações como para dinâmica de reacções autocatalíticas.[240]

b) **Culturas de suspensão**

A proliferação em culturas de suspensão era avaliada pelo número de células contado num contador Coulter automático, corrigido para a percentagem de células viáveis (obtido pela coloração com Azul Tripano (1)). A proliferação em suspensão era assim determinada em culturas de linhas celulares leucémicas em que o crescimento rápido e exponencial pode mostrar diferenças quantitativas significativas.

No caso de culturas de medula normal ou de células leucémicas primárias (*ex vivo*) estas diferenças são geralmente pouco significativas (2), pois o número de células capazes de divisão em cultura é diminuto em relação ao número total de células e a sua capacidade proliferativa finita (isto é verdade mesmo em relação a células leucémicas primárias em cultura). Nestas culturas pode-se avaliar o número e capacidade de células clonogénicas por recultura em meio semi-sólido (ver abaixo em "Avaliação da diferenciação").

Outros meios há, e foram usados nalgumas experiências, para avaliar as células em cultura. Serão tratados nas secções de "Incorporação de ^{3}H-TdR" e "Citofluorometria de fluxo".

6) AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO EM CULTURA

a) **Culturas semi-sólidas (agar)**

Para avaliar o grau de diferenciação em cultura, preservando a estrutura dos clones e a relação entre as células que os constituem, desenvolveu-se uma técnica a partir da descrita por P. Jacobs et al[233] - a **técnica da coloração *in situ*:**

- O gel de agar era cuidadosamente descolado do disco de Petri numa tina cheia com PBS e "pescado" com uma rede metálica para uma lâmina de modo a que ficasse em posição inversa à que tinha no disco (camada nutritiva para cima e camada superior em baixo). Aproveitando a diferença de textura entre as 2 camadas (0.5% e 0.3% agar) conseguia-se dissecar entre elas e rejeitar a camada nutritiva (que não interessava para efeitos de análise de diferenciação) ficando só com a camada contendo as células que haviam sido estimuladas (no caso das técnicas de camada única esta manobra era obviamente desnecessária). O gel era então achatado uniformemente por pressão suave e contínua (geralmente lâminas de vidro grossas) e desidratado por interposto papel de filtro (Whatman filter paper no.50) e toalhas de papel durante 15 a 20 min. Depois de se retirar cuidadosamente o papel de filtro de modo a não descolar a fina película aderente à lâmina, deixava-se secar completamente.

(1) 0.1% concentração final.
(2) as variações são em regra absorvidas pelo erro do método de contagem.

Nalguns casos as culturas eram previamente fixadas com glutaraldeido (1) e tornava-se necessário eliminar este (que por possível interacção com o indicador de pH do meio - vermelho fenol - prejudicava a nitidez das colorações) pelo que o gel era previamente lavado com mudanças sucessivas (5-6) de PBS até ficar incolor.

As lâminas preparadas por este método podiam posteriormente ser coradas por diversas técnicas Romanowski e citoquímicas (com algumas restricções nas fixadas com glutaraldeido).

Colorações:

- **Wright-Giemsa** - as lâminas eram incubadas numa solução de tampão de fosfatos 0.066M pH = 6.8 contendo 5% corante de Wright (Sigma Chemicals) e 5% Giemsa (R.A.Lamb) durante 5 minutos, lavadas em água destilada e secas.[30]

- **Dupla esterase** (2) (só para culturas não previamente fixadas com glutaraldeido) - modificação da técnica de Li, Lam e Yam[241] - as lâminas eram fixadas durante 1 min a 4º C. em formol-acetona tamponado (pH = 6.6), lavadas em água destilada e secas; incubadas durante 15 min numa solução para "esterase cloroacetato" (95 ml de tampão de fosfatos pH = 7.4 com 100 mg de Fast Blue BB Salt, ao qual se juntavam 10 mg de naftol AS-D cloroacetato dissolvidos em 5 ml de N,N-dimetilformamida), novamente lavadas em água destilada e secas; incubadas durante 25-30 min na solução para "esterase inespecífica" (95 ml de tampão de fosfatos pH = 6.3 com 100 mg de Fast Garnet GBC Salt ao qual se juntavam 100 µl de α-naftilbutirato diluidos em 5 ml de etilenoglicolmonometileter), lavadas e secas; e finalmente contrastadas com hematoxilina de Carazzi (4 min) ou com verde metilo (2 min), lavadas com água da torneira e secas. Os reagentes Fast Blue e Fast Garnet, naftolcloroacetato e α-naftilbutirato, dimetilformamida e etilenoglicol, foram todos obtidos de Sigma Chemicals.

- Ocasionalmente foram também coradas lâminas pelo Azul Rápido Luxol para

---

(1) a fixação com glutaraldeido tornava-se necessária sempre que não era possível fazer a contagem de clones imediatamente a seguir às culturas serem retiradas da incubadora; este procedimento permitia a conservação das culturas a +4º C. (em caixa selada para evitar a desidratação), por tempo indeterminado.

(2) As células da linha granulocítica (os eosinófilos têm padrão de positividade irregular sendo frequentemente negativos) têm actividade esterásica dita específica (cloroacetato) pois é exclusiva desta linha, pelo menos dentro do sistema hemolinfopoiético, e é expressa a partir do estadio de mieloblasto/promielócito. As células monocíticas têm actividade esterásica não específica (α-naftilbutirato) a qual aumenta com a maturação e é especialmente forte nos macrófagos; esta actividade, não sendo exclusiva desta linha, é no entanto altamente característica pelo tipo de positividade encontrado. A esterase α-naftilbutirato é mais especificamente monocítica que outras isoenzimas (α-naftilacetato, naftol ASD acetato) cuja expressão em linfócitos e megacariócitos é por vezes proeminente.[242] As células da linha granulocítica não têm habitualmente positividade inespecífica.[243]

identificação de eosinófilos[30,54,244] e pela o-Dianisidina para identificação de células eritroides pela actividade peroxidásica da hemoglobina, segundo técnica publicada pelo próprio.[54]

As culturas coradas pelas técnicas descritas eram então observadas ao microscópio com uma amplificação de x630 (ou superior) e os clones eram classificados como maduros (clones que só continham granulócitos e/ou monócitos/macrófagos maduros), imaturos (clones que só continham células imaturas) e mistos (com células maduras e imaturas). Os critérios para a classificação das células basearam-se no tamanho celular, relação núcleo/citoplásmica, presença ou ausência de nucléolo(s), aspecto da cromatina, segmentação nuclear, basofilia ou granulação citoplásmica, expressão de actividade esterásica específica ou inespecífica e configuração da célula.

Para exprimir a maturidade das culturas foram testados diversos índices de maturidade (I.M.). Dois revelaram-se particularmente úteis: 1) **I.M.1**, definido pela divisão do número de clones contendo células maduras (clones maduros e mistos) pelo número de clones constituídos só por células imaturas. Este índice de maturidade foi utilizado na apreciação da resposta de células normais e leucémicas a diferentes concentrações de CSF, pois verificou-se que a sua transformação logarítmica (log I.M.) tinha uma relação linear com a concentração de células na camada nutritiva produtora do estímulo. A presença de linearidade numa larga extensão da curva dose-resposta era vantajosa para a análise da resposta (1); 2) **I.M.2**, definido pela divisão do número de clones constituidos únicamente por células maduras pelo número de clones contendo (total ou parcialmente) células imaturas. Este índice foi utilizado nas experiências com a isoferritina acídica, pois o incremento de diferenciação observado com a incubação com esta proteína aconselhou a que se aumentasse o denominador do índice devido à existência de poucos clones totalmente constituidos por células imaturas e às grandes variações do índice calculado dessa maneira. No entanto, a variação do índice I.M.1 era aproximadamente paralela à do índice I.M.2.

"Recloning":

Este é um modo de avaliar o estadio de diferenciação através da capacidade (clonogénica e de linhagem) das células finais de uma cultura primária. Camadas superiores eram removidas das culturas, transferidas para um volume igual de McCoy' s com SBF e suavemente desfeitas até se formar uma suspensão celular; as células eram então recultivadas, usando novas camadas nutritivas. Alternativamente, aspiravam-se directamente clones individuais: cada clone era desfeito por aspiração e expulsão através de uma agulha 19 G e as células recultivadas, como descrito para as culturas primárias de agar.

---

(1) Para o desenvolvimento de "assays" biológicos, as respostas que tenham (ou possam ter por meio de uma transformação simples) uma relação linear com o estímulo, apresentam inúmeras vantagens.[240]

b) **Culturas de suspensão**

Nestas culturas é mais fácil a recuperação das células (simples centrifugação e lavagem) e mais nítida a apreciação morfológica, embora se perca a estrutura clonal existente nas culturas semi-sólidas. Em qualquer altura alíquotas de células podem ser retiradas das culturas.

As células eram lavadas para eliminar os agentes com que haviam sido (ou não, caso dos controles) incubadas. Depois de ressuspendidas em novo meio, eram sujeitas a uma série de testes:

- **Dupla esterase** - igual ao descrito para as culturas semi-sólidas, mas em "cytospins" (200-300 µl de células centrifugadas a 350 rpm numa citocentrífuga Shandon) ou "cytoseds" (sedimentação do mesmo volume, delimitado por um anel);

- **Redução do nitroazultetrazólio** (NAT) - a capacidade de células maduras da linha granulocítica (e, em menor escala, da linha monocítica) de reduzir o nitroazultetrazólio mede a aptidão funcional dessas células para produzir superóxido em resposta à exposição a produtos bacterianos. A produção de superóxido é reconhecidamente um mecanismo bactericida característico da célula madura com plena capacidade funcional.[245] Cinquenta microlitros de suspensão de células eram incubados com 20 µl de sobrenadante de "caldo" de E. coli (cortesia do Dr. Godfrey Smith, Departamento de Microbiologia, Royal Free Hospital) e 100 µl de 0.1% NAT (solução w/v em Hanks' Balanced Salt Solution sem Ca^{++} e Mg^{++} e sem vermelho fenol) durante 15 min a 37° C. (1). O NAT provinha de Sigma Chemicals e a solução de Hanks' (HBSS) de Flow Lab ou Gibco. Imediatamente após o termo da incubação, as células eram citocentrifugadas para uma lâmina e contrastadas com Diff-Quick (Merz & Dade). Eram contadas como positivas as células exibindo depósitos azul-negro de formazan. A coloração com Diff-Quick permitia igualmente a apreciação morfológica das células.

- **Avaliação do potencial proliferativo das células** - faz-se por recultura das células da cultura de suspensão em meio semi-sólido (agar) como atrás descrito. O número de colónias e o número total de clones nestas culturas secundárias, contados ao fim de 7 dias, davam os números de CFC-GM e do total de células com capacidade clonogénica presentes na cultura primária (de suspensão) no ponto-tempo em que se efectuava

(1) Este teste foi padronizado no Departamento de Microbiologia do Royal Free Hospital para avaliação da capacidade de geração de superóxido por células de doentes leucémicos em resposta a infecção bacteriana e, por cortesia do Dr. Godfrey W. Smith, foi-nos permitida a sua utilização mesmo antes da publicação do método. Os lotes de sobrenadante de "caldo" de E. coli ("E. coli broth supernatant") foram também produzidos nesse Departamento e titulados para uma actividade estimulante constante.

a recuperação das células (1). Em certas experiências, foram recultivadas células de uma cultura primária semi-sólida, após recuperação de células por aspiração. Este tipo de recultura difere do anteriormente descrito "recloning" pelo facto de as células aspiradas não estarem incorporadas no gel de agar e portanto a camada-alvo não ser removida da cultura. Resumidamente, ao fim de 7 dias de incubação, deitava-se cerca de 1 ml de meio de cultura em cada disco de Petri, tendo o cuidado de infiltrar algum deste volume debaixo do gel (camada única) de modo a remover células aí situadas; agitava-se e aspirava-se o sobrenadante. Estas experiências foram motivadas pela observação de agregados de células (por cima ou por baixo do gel de agar, mas aparentemente não incorporados neste), não identificáveis como clones de granulócitos e/ou monócitos-macrófagos. Estas células, coradas pelo Wright, tinham a aparência de primitivas.

- Outros meios para apreciar a maturidade das células em suspensão incluiram a descrição da sua morfologia em cultura e a observação de aderência ao plástico (característica de monócitos-macrófagos maduros).

7) ELIMINAÇÃO SELECTIVA DE SUBPOPULAÇÕES ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE CSF

a) Anticorpos monoclonais reagindo com determinantes antigénicas presentes em subpopulações T

O anticorpo OKT3 (Ortho Diagnostics, Raritan, N.J.) reconhece o antigénio CD3 de 19-29 Kd e marca 95% dos linfócitos T periféricos e 96% dos T medulares. É uma IgG e é mitogénico.[246]

O anticorpo OKT11a (Ortho Diagnostics) reconhece o receptor para os eritrócitos de carneiro e é uma IgG. Marca 99% das células T periféricas e da medula (antigénio CD2, de 50 Kd).[247]

O anticorpo MBG6 (IgM, oferta do Dr. A. McMichael) reconhece um epítopo diferente (antigénio CD6, de 120 Kd) mas uma população sobreponível à marcada pelo OKT3.[248]

Os anticorpos OKT8 (IgG2, Ortho Diagnostics) e RFT8 marcam a subpopulação T citotóxica/supressora e reconhecem um antigénio de 32 Kd, CD8.[246,249] RFT8 é uma IgM e foi amavelmente cedido pelo Departamento de Imunologia do Royal Free Hospital (Prof. G. Janossy) onde é produzido.[250]

Todos estes anticorpos (à excepção do OKT8) são líticos com complemento de coelho.

---

(1) Foi anteriormente demonstrado que a diferenciação de um progenitor mieloide está associada a diminuição do seu potencial proliferativo, isto é, do número de células que ele é capaz de gerar,[29,32] e a uma restricção no seu potencial de linhagem, isto é, do número de linhas (neutrofílica, eosinofílica, monocítica) a que pode dar origem.[30] Assim a capacidade clonogénica de uma célula num dado ponto-tempo mede o seu estadio de diferenciação.

b) **Citotoxicidade mediada pelo complemento**

Para estudar a influência relativa de subpopulações de linfócitos T na produção de factores capazes de estimularem a proliferação e diferenciação de progenitores mieloides, procuraram-se eliminar selectivamente populações marcadas por diferentes anticorpos e incorporar as células mononucleares delas depletadas em camadas nutritivas que iam estimular células-alvo.

Para tanto usou-se a seguinte técnica de citotoxicidade[251]: células mononucleares de sangue periférico suspensas em McCoy's 5A suplementado com 15% SBF inactivado pelo calor (SBF-IC) eram incubadas com concentrações saturantes do anticorpo relevante (2 µl/10^6 células no caso de anticorpo purificado, 50 µl/10^6 células no caso de sobrenadante) a 21° C., durante 30 minutos. No fim da incubação, as células eram recuperadas por lavagem e centrifugação, ressuspendidas em Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) suplementada com 10% SBF-IC e incubadas com complemento de coelho (Buxted Rabbit Co., U.K., ou Pel-Freeze) (1) na proporção de 1:1, durante 45 minutos a 37° C.. Antes de utilizado, o complemento era filtrado em filtros millipore 0.22 µm (Millipore, U.K.). Cinco minutos antes de terminar esta incubação, 2.5 U/ml DNAse (Staphylococcal nuclease, Boeringher Mannheim ou Sigma) eram adicionadas para remover o "limo" de ADN e impedir a formação de agregados de células. As células eram então lavadas novamente em HBSS com SBF-IC e ressuspendidas em McCoy' s 5A com SBF. As percentagens de células viáveis e de células com fluorescência de membrana eram determinadas usando uma técnica de dupla coloração com Ig de cabra anti-ratinho fluoresceíno-conjugada (FITC-G α M, "fluorescein isothiocyanate-goat anti mouse") e brometo de etídio (BE)[252]: iguais volumes de células e FITC-G α M (concentração previamente testada para actividade óptima) eram incubados durante 10 min à temperatura ambiente (TA); as células eram lavadas 3x, rejeitando-se o sobrenadante após a última lavagem de modo a deixar apenas cerca de 50µl de suspensão no fundo do tubo; adicionavam-se 20 µl de uma diluição 1:500 da solução stock (0.01 mg/ml) de BE e examinavam-se as células imediatamente num microscópio de fluorescência Zeiss (alternadamente fluorescência e contraste de fase, para cada campo); calculavam-se então as percentagens de células que incorporavam BE (mortas) ou não (viáveis), com fluorescência de membrana (anticorpo fixado) ou não (negativas).

Igual procedimento foi seguido, de princípio a fim, nos controles (só anticorpo, só complemento) nos quais as incubações com complemento ou com anticorpo, respectivamente, foram substituídas por incubação com meio de cultura.

Após o tratamento descrito, as células residuais eram incorporadas nas camadas

---

(1) os lotes de complemento tinham sido previamente testados para presença de actividade citotóxica própria (em linfócitos periféricos, com Azul Tripano; e inibição de CFC-GM em cultura). Só eram usados lotes sem citotoxicidade intrínseca.

nutritivas, de modo a que a concentração de células viáveis fosse de 10^6. ml^{-1}; ou, no caso dos estudos dose-resposta (1), os valores foram corrigidos, na análise de resultados, para a percentagem de células viáveis.

Nalgumas experiências, foram adicionadas selectivamente subpopulações OKT4+ e OKT8+ às células depletadas de células OKT3/MBG6 positivas. Estas preparações (OKT8 - 92% de células OKT8+; OKT4 > 90% de células OKT4+ e só 1% OKT8+) foram preparadas a partir de linfócitos autólogos por separação em colunas revestidas de anticorpo, por cortesia de Nick Tidman e Sylvia Granger do Departamento de Imunologia do RFH.[253]

8) ESTUDO DO EFEITO DE VÁRIOS AGENTES SOBRE A PROLIFERAÇÃO E A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS NORMAIS, LEUCÉMICAS E PRÉ-LEUCÉMICAS

a) **Drogas**

Foram usadas soluções de trabalho preparadas de fresco de:

- **ácido retinoico** (RET), all-trans (Sigma Chemical Co., Poole, U.K.) e 13-cis, etretinato, etretina e RO 13-6298 (2) (Hoffman - La Roche), 10^{-2} M em etanol absoluto (10^{-3} M para a etretina);
- **N-metilformamida** (N-MF, Aldrich Chemical Co., Gillingham, U.K.), 0.6 M em meio de cultura;
- **6-mercaptopurina** (6-MP, pura, doada pela Wellcome Foundation Ltd.), $5x10^{-2}$ M em O. 1N NaOH;
- **citosina-arabinosídeo** (ARA-C, Upjohn Ltd., Crawley, U.K.), 10^{-2} M em água esterilizada e bi-destilada;
- **afidicolina** (APH, Sigma Chemical Co.), 10^{-3} M em propano-1,2-diol;
- **6-tioguanina** (6-TG, Sigma Chemical Co.), $5x10^{-2}$ M em O. 1N NaOH.

A concentração do diluente era ajustada, de modo a manter-se constante para as diversas concentrações de droga usadas, bem como para os respectivos controles. A concentração final de etanol era de 1 para 10000, de 0.1N NaOH de 1 para 500 e de propano-1,2-diol de 1 para 1000 (v/v).

---

(1) camadas nutritivas preparadas com número variável (oscilando entre 0 e $1x10^6.ml^{-1}$) de células mononucleares depletadas previamente de células RFT8+ (incubação com RFT8 + C). A capacidade de estas camadas nutritivas promoverem a proliferação e a diferenciação de células-alvo era avaliada do modo anteriormente descrito (em "Avaliação da proliferação" e "Avaliação da diferenciação"), examinando a resposta a diferentes concentrações de células/camada nutritiva.

(2) 13-cis ácido retinoico, etretinato, etretina e RO 13-6298 só foram usados para comparação de efeitos de diversos retinoides.

b) **"Design" experimental para combinações de agentes diferenciantes**

- culturas de suspensão - células medulares (< 1.077 $g.cm^{-3}$) cultivadas em suspensão em microplacas (96 "wells") de fundo chato (Nunc), em tetraplicado para cada condição. A concentração inicial de células era $0.5x10^5.ml^{-1}$. Em regra, eram testadas 25 diferentes condições (1), correspondentes a 4 concentrações diferentes de um agente vezes 4 concentrações diferentes do outro indutor de diferenciação (6-TG e 6-MP - 10^{-4} a 10^{-7} M; ARA-C - 10^{-5} a 10^{-8} M; APH e RET - 10^{-6} a 10^{-9} M; N-MF - $3x10^{-1}$ a $3x10^{-4}$ M), a um diluente vezes as 4 diluições da outra droga e vice-versa e só diluentes (como controle absoluto);

- culturas semi-sólidas - técnica de dupla camada, com estímulo fornecido por uma camada nutritiva de leucócitos periféricos.As células de medula eram incorporadas na camada-alvo na concentração de $1x10^5.ml^{-1}$. Nalguns casos, avaliou-se a diferenciação dos clones *in situ* nestas culturas, como atrás descrito.

c) **Análise da proliferação e da diferenciação**

Feitas de acordo com o que foi já descrito nos pontos 6 e 7, respectivamente.

c) **Teste de interacções de drogas**

Usou-se o método gráfico de Loewe e Muischnek, construindo isobolos (linhas de efeito igual) a partir de múltiplas curvas dose-resposta (geralmente 5 concentrações diferentes de cada droga, 0 incluido). Os isobolos eram traçados tendo em conta a concentração de cada droga, só ou em combinação, que produzia um determinado efeito (20%,30% ou 50% do efeito máximo).[254]

Isobolos lineares indicam efeito aditivo, isobolos curvilíneos de convexidade superior indicam antagonismo e isobolos curvilíneos de convexidade inferior indicam sinergismo.

---

(1) Em algumas experiências, o número de condições foi reduzido para 16 por eliminação da diluição mais baixa de cada agente.

9) ESTUDO DO EFEITO DA ISOFERRITINA ACÍDICA (IFA) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO GRANULOMONOCÍTICA NORMAL

a) **Preparações de isoferritina**

Foram utilizadas três preparações de isoferritina acídica (ricas em subunidades H) e uma de básica. Das preparações de IFA, duas foram purificadas a partir do baço de um doente com LMC e amavelmente cedidas pelo Prof. H.E. Broxmeyer (Indianapolis, Indiana, U.S.A.): uma tinha sido altamente purificada por focagem isoeléctrica a pH = 4.7 e a segunda simplesmente enriquecida em subunidades H.[157] A terceira preparação rica em IFA (ferritina de coração) e a preparação de ferritina básica (baço) foram gentilmente cedidas pelo Prof. A. Jacobs e Dr. Mark Worwood (University of Wales, Cardiff, U.K.).[255] Estas duas últimas preparações estavam conservadas diluidas em PBS com 0.04% azida sódica. Utilizaram-se os controles apropriados nas várias experiências (nas concentrações de ferritina usadas nas experiências, a concentração de azida sódica nunca excedia 0.4 $\mu g.ml^{-1}$).

b) **Anticorpo anti-ferritina**

O anticorpo anti-ferritina acídica foi também facultado por cortesia do Prof. Allan Jacobs e Dr. M. Worwood. Tinha sido produzido em coelhos por injecção nestes de ferritina de coração saturada de ferro.[255] O anticorpo estava conservado numa solução de 0.04% azida sódica em PBS e por isso era dialisado contra HBSS durante a noite para eliminar a azida. O anticorpo foi usado na concentração final de 1:80 contra 10 $\mu g.ml^{-1}$ de ferritina. A mistura ferritina-anticorpo era incubada durante 1 hora a 37° C. e 1 hora a 4° C. e centrifugada (11000g), seguindo indicação do Dr. Mark Worwood. O sobrenadante era filtrado (filtro Millipore 0.22 µm) e usado nas mesmas concentrações que a ferritina não tratada (isto é, na concentração de ferritina que estaria presente se não se desse imunoprecipitação da proteína).

Como controle, usava-se igualmente anticorpo isolado (sem adição de ferritina) na mesma concentração (1:80).

c) **Culturas**

Nestas culturas tentou-se evitar a contaminação por ferritina exógena e tanto quanto possível a sua produção em cultura. Para isso, as células cultivadas eram previamente depletadas de células aderentes, reconhecidamente produtoras de IFA.[161] Como fonte de estímulo, usou-se um meio condicionado que não continha IFA, o 5637 CM.[161]

c) **Análise da diferenciação**

Foi feita por coloração de clones *in situ* por dupla esterase e por avaliação de alíquotas das culturas de suspensão (dupla esterase, NAT, recultura), como atrás descrito.

d) **Técnica do suicídio por incorporação de timidina tritiada (^{3}H-TdR) de alta actividade específica**

Dois ml de 2-4x10^6 células.ml^{-1} eram incubadas com 80 µl de 25 Ci/mmol ^{3}H-TdR (1 mCi/ml, Amersham Radiochemicals), com 80 µl de timidina fria (9.6 mg/l, a mesma concentração da timidina marcada) ou com 80 µl de meio de cultura, durante 20 min a 37° C.. A reacção era interrompida por lavagem em McCoy' s refrigerado em gelo, contendo heparina e 100 µg/ml timidina fria. As células eram novamente lavadas em McCoy's, ressuspendidas e cultivadas.[158]

10) ESTUDO DO EFEITO DA DESFERRIOXAMINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO E A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS NORMAIS E LEUCÉMICAS

A Desferrioxamina (DFX) é uma hidroxilamina que reage estoiquiometricamente com iões férricos formando um complexo, ferrioxamina, altamente estável.[256] É usada, como quelante de ferro, em situações caracterizadas por hipersiderémia tais como a hemocromatose idiopática e a hemosiderose por sobrecarga transfusional. A DFX parece quelar ferro de um "pool" lábil no interior da célula,[257] sendo incapaz em condições fisiológicas de subtrair Fe de núcleos heme ou ligado à transferrina.[256] É ainda duvidoso que possa quelar *in vivo* Fe incorporado na molécula de ferritina.[258]

Para estudar o efeito de DFX sobre progenitores normais e leucémicos, usou-se uma preparação farmacêutica da Ciba-Geigy. Quinhentos mg de DFX eram dissolvidos em 5 ml de água esterilizada bidestilada e subsequentemente diluidos em meio de cultura (McCoy' s 5A ou RPMI 1640, conforme as circunstâncias). A solução era filtrada (filtro Millipore 0.22 µm) e usada no mesmo dia, devido à relativa instabilidade do quelante quando diluido. A DFX era usada em concentrações que variaram entre 10^{-4} M e 10^{-6} M.

A acção da DFX foi comparada nalgumas experiências com a da Hidroxiureia (HU). A HU é uma droga citotóxica que inibe selectivamente a ribonucleotido reductase, uma enzima da síntese *de novo* de ADN.[259] A HU (Sigma Chemical Co.) era dissolvida em água esterilizada bidestilada até uma concentração de 0.1 M e as alíquotas eram

congeladas a -20º C.. Quando necessárias, as alíquotas eram descongeladas e diluidas em meio de cultura. A HU foi geralmente utilizada em concentrações entre 10^{-4} M e 10^{-6} M.

Para verificar se o efeito da DFX era devido à sua acção quelante de Fe ou a qualquer outra actividade da molécula, usaram-se também controles em que à DFX se adicionavam quantidades equimolares de $FeCl_3$ (Sigma Chemicals) dissolvido em meio de cultura.

A acção da DFX foi observada em culturas semi-sólidas e de suspensão de medula normal e em culturas líquidas de linhas celulares leucémicas (HL60, ML2, K562). As culturas semi-sólidas "teste" continham DFX, tendo como controle células cultivadas sem DFX. Também foram feitas experiências em que eram cultivadas, na ausência de DFX, células que tinham estado expostas por períodos de tempo variáveis à DFX, com o intuito de verificar se a acção desta era de natureza imediata ou se pelo contrário era de efeito contínuo, mediado pela quelação de Fe. No fim da incubação, as células eram lavadas pelo menos duas vezes e cultivadas como descrito, em paralelo com células incubadas com meio de cultura e sujeitas exactamente às mesmas manobras.

A análise da proliferação e da diferenciação celulares em cultura foi feita segundo os métodos descritos nos pontos 5 e 6 respectivamente.

11) EFEITO DE ANTICORPOS CONTRA O RECEPTOR DA TRANSFERRINA SOBRE CÉLULAS LEUCÉMICAS EM CULTURA

O receptor da transferrina (Rec. TF.) é uma glicoproteína transmembrana de 180 Kd constituida por 2 cadeias de 90000 daltons ligadas por pontes dissulfídricas. A maior parte da molécula (2 x 70 Kd) está localizada no exterior da célula. Estes 2 fragmentos de 70 Kd não estão ligados por pontes dissulfídricas e cada um deles pode "ligar" uma molécula de transferrina saturada. O Rec. TF. é predominantemente fosforilado em resíduos de serina.[260-262]

A transferrina saturada tem alta afinidade para o seu receptor e a ligação a este desperta um mecanismo de endocitose que constitui a principal via normal de entrada de Fe na célula. Nas vesículas endocitóticas, o pH baixo dissocia o Fe do complexo transferrina-receptor, sendo este recirculado para o exterior da célula. Aqui, a pH fisiológico, a afinidade da apotransferrina para o receptor é muito menor que a da transferrina saturada, havendo dissociação do complexo com início de novo ciclo.[263,264] A apotransferrina vai buscar Fe ao sistema mononuclear-fagocítico, onde é assistida pela ceruloplasmina que actua como ferroxidase convertendo o Fe^{2+} dos macrófagos na forma férrica (Fe^{3+}) capaz de ser transportada pela transferrina.[265,266]

Vários anticorpos monoclonais reconhecendo o receptor da transferrina (Atc.Mc.

α-Rec.TF.) foram descritos e produzidos nos últimos anos.[267-270] Por oferta amável do Dr. Ian Trowbridge (Salk Institute, La Jolla, Califórnia, U.S.A.) foi possível utilizar dois destes anticorpos:

- **B3/25** é uma IgG que reconhece o receptor mas não bloqueia a ligação da transferrina;[267,270]

- **42/6** é uma IgA que se liga ao receptor num ponto idêntico ou próximo do ponto de ligação da transferrina e tem mais afinidade para o receptor que a própria transferrina, inibindo a ligação desta de uma forma competitiva.[269]

O anticorpo B3/25 era conservado diluido em PBS com azida sódica e antes de ser utilizado em cultura era dialisado, durante a noite, contra HBSS sem Ca^{++} ou Mg^{++}. O anticorpo 42/6 vinha na forma de anticorpo purificado, sem conservante.

Nas experiências em que estes anticorpos foram testados (em concentrações variando de 0.5 µg/ml a 20 µg/ml), usou-se para cultura um meio livre de complemento (SBF--IC), para obstar a citotoxicidade mediada pelo complemento. Os efeitos na proliferação e na diferenciação das linhas celulares HL60, ML2 e K562 foram avaliados em diversos pontos-tempo das culturas de suspensão, como atrás descrito.

Estes efeitos foram comparados com os causados pela hidroxiureia (HU) e pelo 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA, Sigma Chemical Co.), um potente promotor tumoral,[271] que induz diferenciação monocítica de HL60.[201,221,272,273] O TPA era diluido até 10^{-5} M em etanol (solução stock, conservada a 4º C.) e posteriormente diluido em meio de cultura para as experiências (geralmente usado a uma concentração de 1.6×10^{-8} M).

Imunofluorescência

No início das culturas (dia 0) determinou-se a percentagem de células positivas para os dois anticorpos anti-Rec. TF.: 0.5-1.0 x 10^6 células em 50 µl de meio eram incubadas com 5 µl de anticorpo durante 10 minutos a temperatura ambiente (T.A.); as células eram então lavadas 3 vezes em PBS com 0.2% albumina bovina e 0.2% azida sódica, ressuspendidas e incubadas com Ig de cabra anti-ratinho conjugada com fluoresceína-isotiocianato (FITC-Gα M) durante 10 minutos a T.A.; as células eram novamente lavadas 3 vezes, ressuspendidas e contadas em lâmina usando um microscópio de fluorescência.

12) INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA TRITIADA

Efeitos precoces (4h e 24h) de certos compostos (drogas, anticorpos) na síntese de ADN foram medidos pela incorporação de timidina tritiada (^{3}H-TdR) no ADN. Durante a última hora de incubação, adicionava-se 1 µCi metil-^{3}H-TdR (actividade específica - 5 Ci/mmol, Amersham Radiochemicals TRA 120) a 0.5-1.0 x 10^6 células diluidas em 0.5 ml RPMI 1640 com 10% SBF-IC, que continha igualmente a droga ou o anticorpo (cujo efeito se pretendia medir) com que as células vinham sendo incubadas. A incubação com timidina processava-se a 37°C. na estufa de CO_2, em duplicado ou triplicado. Ao fim deste tempo, as células eram lavadas com PBS frio, adicionando-se em seguida 2 ml de ácido perclórico 0.5 M durante 10 minutos. Rejeitava-se o sobrenadante após centrifugação, sendo medida a radioactividade incorporada na fracção ácido-insolúvel num contador β (células aquecidas a 80°C. em 0.5 ml de ácido perclórico durante 20 minutos, adicionando-se seguidamente 5-10 ml de líquido de cintilação, Scintillation fluid 199).[274]

Em alternativa, o teste foi feito em placas de microtitulação (3 poços/condição). Cada poço continha 2 x 10^5 células em 200 µl RPMI com SBF-IC e 0.4 µCi ^{3}H-TdR (20 µl) e o período de incubação era igualmente de 1 hora. No fim, as células eram colhidas em filtros num "Cell Harvester" (Dynatech, U.K.) e lavadas com água e metanol, sendo medida a radiação β.

13) ESTUDO DO CICLO CELULAR

O estudo das proporções relativas de células nas diversas fases do ciclo celular pela intensidade de fluorescência incorporada no ADN (a quantidade de fluorocrómo incorporado é directamente proporcional ao conteúdo de ADN da célula) foi feito num FACS ("fluorescence-activated cell sorter", sistema Cytofluorograph 50-H, Ortho Diagnostic Systems).

As células eram fixadas em 70% metanol ou usadas sem fixação (quando fixadas podiam ser conservadas a 4°C. por vários dias). Eram então suspensas em tampão TRIS e incubadas a 4°C. durante 10 minutos numa solução contendo ribonuclease (10 µg/ml) e brometo de etídio (5 µg/ml). Este método é uma modificação do método de L. Vindelov.[275] O perfil de fluorescência era seguidamente determinado por passagem no FACS.

14) CONTROLES E "DESIGN" EXPERIMENTAL

Em cada situação experimental, o efeito que se pretendia avaliar foi comparado com o efeito do controle relevante. O "design" experimental procurava geralmente incluir um ou mais controles que repetissem todas as condições (meios, incubação, diluentes, procedimento, etc) verificadas no manuseamento do objecto de teste, de modo a circunscrever as diferenças entre teste e controle às que eram objecto de investigação. A incubação das culturas era feita exactamente nas mesmas condições com distribuição ao acaso dos discos de petri de teste e controle, de modo a suprimir qualquer enviezamento. Os meios de cultura eram rigorosamente iguais (mesmo lote) e, quando era usado diluente (no teste), o controle continha uma concentração idêntica do mesmo. Teste e controle eram conduzidos paralelamente através dos diversos passos das técnicas.

Para cada condição, eram semeados 3 a 5 discos e obtinha-se a média dos números de colónias contando todos eles. A contagem de colónias era cega, com codificação (ou ocultação da identificação) do disco.

De igual modo, os testes de diferenciação eram geralmente feitos em duplicado e o número de células (ou clones) classificadas por condição era normalmente igual ou superior a 200 (à excepção de situações em que o número de células ou clones visualizáveis fosse inferior). Também as lâminas eram codificadas e os códigos só eram levantados quando da análise dos resultados.

A especificação mais detalhada dos controles (incluindo controles específicos de determinadas situações) e do "design" experimental que presidiu às várias experiências é feita nas diversas secções em que se descreve o trabalho experimental (em Materiais & Métodos e Resultados).

15) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Particularizada nas diferentes secções.

QUADRO I. Dados clínicos dos doentes com L.A.M.

Doente	Sexo	Idade	FAB	Remissão	Duração de remissão	Ciclos até remissão
A	F	59	M1	Sim	>85 m.	2
B	M	64	M5a £	Não	-	-
C	F	42	M1	Sim	>33 m.	2
D	M	48	RAEB-T	Sim	6 m.	3
E	M	51	M5	Sim	22 m.	1
F	F	59	M2 §	Não	-	-
G	F	71	M4	Não	-	-
H	F	61	M2 $	RP	2 m.	1

Duração de remissão - última informação sobre os doentes em Outubro de 1985 (> - ainda em remissão naquela data).
£ terapêutica subóptima.
§ consecutiva a RAEB-T.
$ história anterior sugere que a L.A.M. foi precedida de S.M.D..
RP Remissão parcial caracterizada por uma percentagem de blastos inferior a 5%, mas mantendo morfologia dismielopoiética, e de curta duração.
Abreviaturas: FAB - French-American-British classification[276,277]
RAEB-T - Refractory anaemia with excess of blasts[277]

RESULTADOS

1 - RESPOSTA DE PROGENITORES GRANULOMONOCÍTICOS NORMAIS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GM-CSA

Em culturas de medula óssea normal em agar, estimuladas por GM-CSA exógeno, verificava-se, com o tempo de cultura, aumento progressivo do tamanho e da maturidade dos clones. Na fig. 3, pode-se ver que a percentagem de clones contendo neutrófilos maduros aumenta até um *plateau* de cerca de 80% entre os dias 5 e 7 de cultura, começando então a descer. A percentagem de clones contendo blastos desce progressivamente, sendo quase nula ao dia 7. A percentagem de clones contendo macrófagos começa a subir significativamente a partir do dia 5 e esta subida estende-se para lá do dia 7, até ao dia 14 (dado não apresentado na figura). Os clones contendo eosinófilos, não representados na figura, acompanham a evolução dos clones que contêm macrófagos.

Em relação ao grau de maturidade dos clones, a média de 5 experiências com culturas de 7 dias, maximamente estimuladas, de células normais deu valores de $4.4 \pm 1.5\%$ (média ± erro padrão) para clones exclusivamente constituídos por células imaturas (blastos e precursores mieloides), $33.8 \pm 1.7\%$ para clones formados exclusivamente por células maduras e $61.8 \pm 1.3\%$ para clones contendo tanto células maduras como imaturas.

Também se estudou a resposta de progenitores mieloides normais e de leucemia mieloide crónica a diferentes concentrações de GM-CSA (1), sob o ponto de vista de diferenciação morfológica em cultura. Verificou-se que a diferenciação morfológica dos clones formados pelas células-alvo estimuladas, medida por um índice de maturidade (IM 1), aumentava com a concentração de GM-CSA. O índice IM 1 é definido pela razão do número de clones contendo células maduras pelo número de clones formados só por células imaturas. Este particular índice de maturidade foi seleccionado de entre vários índices de maturidade avaliados, devido ao facto de a sua transformação logarítmica (log IM 1) apresentar a relação mais linear com o estímulo GM-CSA (fig. 4-a), o que oferece vantagens em termos de avaliação quantitativa da resposta.[240]

Esta resposta dos progenitores mieloides (CFC-GM) à actividade diferenciante do GM-CSA é, no entanto, complicada pelo facto de a população-alvo não ser uma população pura, representativa do mesmo estadio de maturação. Há coexistência de progenitores em diversos estadios de maturação e logicamente progenitores mais jovens levarão

(1) A concentração de GM-CSA é representada pela concentração de células mononucleares periféricas na camada nutritiva. Foi anteriormente demonstrado haver uma relação linear entre esta concentração e a formação de colónias e clones na camada-alvo.[239]

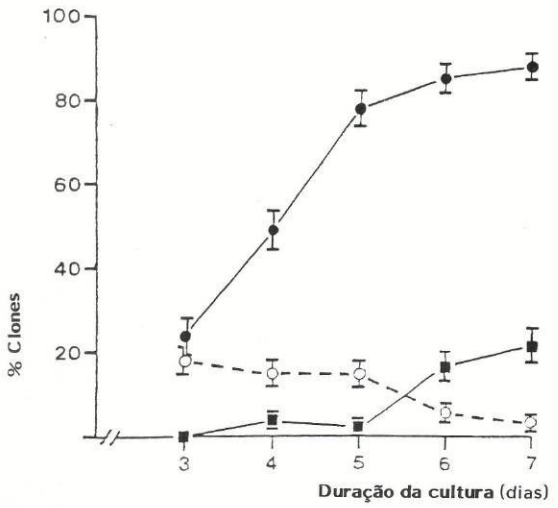


Fig. 3 - Maturação das células clonais com o tempo de cultura. O gráfico representa as percentagens (± desvio padrão) de clones contendo neutrófilos maduros (•), macrófagos (■) e blastos/células indiferenciadas (o). Foram contados 100 clones consecutivos em cada dia de cultura (do dia 3 ao dia 7). As camadas nutritivas eram constituídas por $10^6.ml^{-1}$ células medulares não tratadas.

mais tempo a atingir a maturidade terminal do que progenitores mais maduros, se o ritmo de diferenciação for constante para as diversas células. Observada de um ponto--tempo fixo, a progenia dos primeiros tenderá assim a ser mais imatura que a dos segundos. Por outro lado, o aumento de concentração de GM-CSA vai recrutar progenitores progressivamente mais jovens, estimulando-os a proliferar.[29] Poder-se-ia assim antecipar a existência de duas influências opostas na maturidade dos clones quando se aumenta a concentração de GM-CSA: por um lado, uma tendência para aumentar o grau de diferenciação celular, produzindo uma progenia mais madura; por outro, o recrutamento de células mais jovens que levariam mais tempo a diferenciar-se completamente, o que analisado num ponto-tempo fixo (7 dias, geralmente) implica menor maturidade desses clones.

Isto mesmo se observou nas experiências com células normais (fig. 4-a), em que se notava perda de linearidade da curva dose-resposta, com baixas concentrações de GM-CSA. O *plateau* observado com altas concentrações de GM-CSA poderá também ser explicado por neutralização do incremento em efeito diferenciante pelo "efeito de recrutamento". No entanto, a maior parte da curva é linear, podendo a análise da resposta ao CSA em termos de diferenciação constituir-se em "bioassay".

Os progenitores de doentes com leucemia mieloide crónica (LMC) tinham, quando comparados no mesmo sistema com estimulação por camadas nutritivas idênticas, um

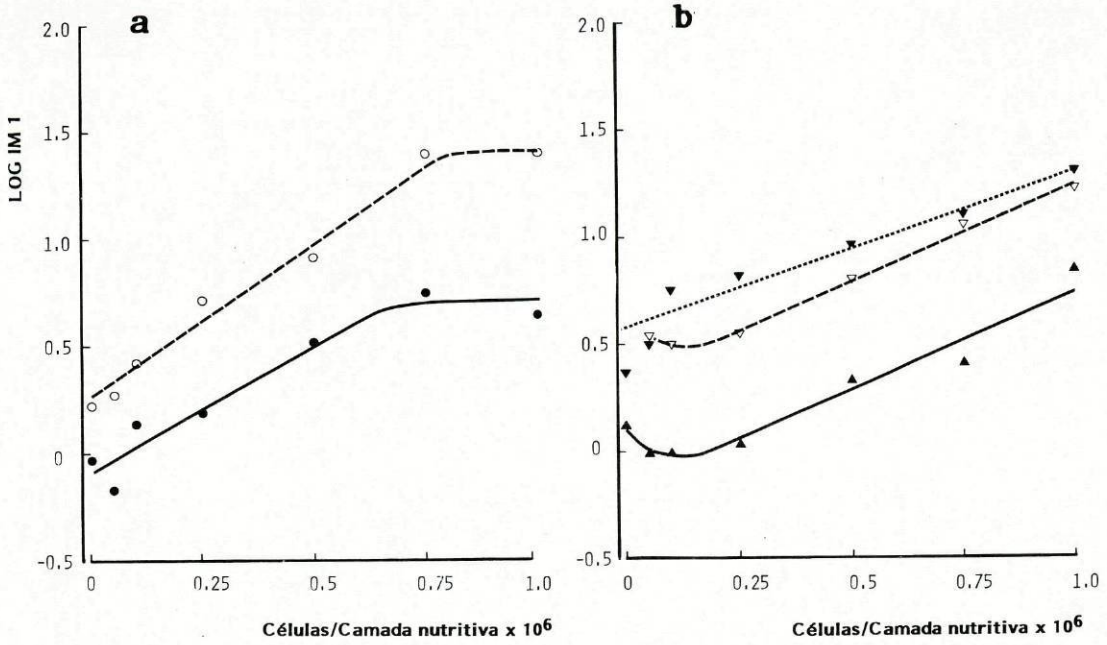


Fig. 4 - Curvas dose-resposta diferenciante representativas de (a) células medulares de 2 voluntários normais (o , •) e (b) alíquotas de células criopreservadas de 3 doentes com LMC Ph^{1+} (▽,▲,▽). O estímulo para a proliferação e diferenciação das células-alvo era fornecido por células mononucleares de sangue periférico incorporadas em camadas nutritivas nas concentrações assinaladas. O índice de maturidade (I.M.1) foi calculado a partir de contagens diferenciais em culturas de 7 dias, coradas *in situ*, e corresponde à razão do número de clones total ou parcialmente formados por células maduras pelo número de clones contendo exclusivamente células imaturas. As respostas não são directamente comparáveis já que foram usadas camadas nutritivas diferentes de experiência para experiência. A perda de linearidade a baixa dose era previsível numa base teórica (ver texto). A presença de *plateau* com doses altas não se limitava às células normais, foi também observada nalgumas experiências (não representadas) com células de LMC.

grau de diferenciação que não era significativamente diferente do das células de medula óssea normal e a resposta ao GM-CSA é também linear (fig. 4-b). Dada a facilidade com que se podem obter largas quantidades de células de LMC (nomeadamente de sangue periférico) para armazenamento (criopreservadas) estas providenciam assim uma forma lógica e exequível de padronização do sistema.

O GM-CSA induz a diferenciação de progenitores mieloides normais e este efeito é dose-dependente

2 - RESPOSTA DE PROGENITORES NORMAIS A DIFERENÇAS QUALITATIVAS DE CSA

A camada nutritiva, que estimula a proliferação e a diferenciação de progenitores mieloides normais, é constituída por leucócitos de sangue periférico (ou, mais convenientemente, em termos de linearidade do "assay", pela sua fracção mononuclear), imobilizados em 0.5% de agar. Quando se tratavam estas células mononucleares (densidade < 1.077 $g.cm^{-3}$) de sangue periférico com a combinação dos anticorpos monoclonais OKT3 e MBG6, os quais reconhecem epítopos diferentes mas populações sobreponíveis de linfócitos T,[248] e complemento (C) (1), verificava-se a produção de um estímulo qualitativamente diferente. Assim, nas culturas estimuladas por camadas nutritivas constituidas por células mononucleares previamente depletadas de células OKT3/MBG6 positivas, havia menor proporção de clones contendo neutrófilos e macrófagos maduros que nas culturas controle (2), ao mesmo tempo que aumentava a percentagem de clones formados por células indiferenciadas e blastos (fig. 5). Estas percentagens eram dadas por avaliação morfológica e citoquímica (dupla esterase). Também a capacidade de "recloning" aumentava com o tratamento com OKT3/MBG6 + C (fig. 6), indicando que os factores solúveis produzidos pela fracção mononuclear depletada de células OKT3/MBG6 positivas atrasam a diferenciação mieloide em cultura, ou não a estimulam na mesma medida que os factores produzidos por células mononucleares não tratadas. Surpreendentemente, o tratamento com OKT11a (e C), anticorpo com espectro quase sobreponível aos anteriores e que reconhece o receptor para os eritrócitos de carneiro,[247] não produzia qualquer efeito na diferenciação celular. Aliás, o efeito só era obtido quando se utilizavam os 2 anticorpos, OKT3 e MBG6, em conjunto, não se verificando quando qualquer um deles era usado isoladamente. Isto deve-se provavelmente ao facto de só se obter máxima eliminação ("killing") de células OKT3/MBG6 positivas com o uso simultâneo dos 2 anticorpos (Quadro II).

A alteração qualitativa do estímulo produzido por esta subpopulação celular é aparentemente independente de variações quantitativas de CSA. Assim, camadas nutritivas depletadas de células OKT3/MBG6 positivas eram capazes de estimular a formação de um número de clones não significativamente diferente de camadas nutritivas não tratadas ou tratadas com OKT11a + C, como se pode ver no Quadro III. O tamanho dos

(1) Esta combinação de anticorpos e complemento remove 95% dos linfócitos T periféricos e 96% dos linfócitos T medulares.

(2) Camadas nutritivas formadas por células mononucleares de sangue periférico não tratadas (8 experiências), por células tratadas só com anticorpo, só com complemento ou com líquido ascítico irrelevante (10 experiências), por células tratadas com OKT11a + C (11 experiências) ou por células tratadas isoladamente com OKT3 ou MBG6 + C (4 experiências).

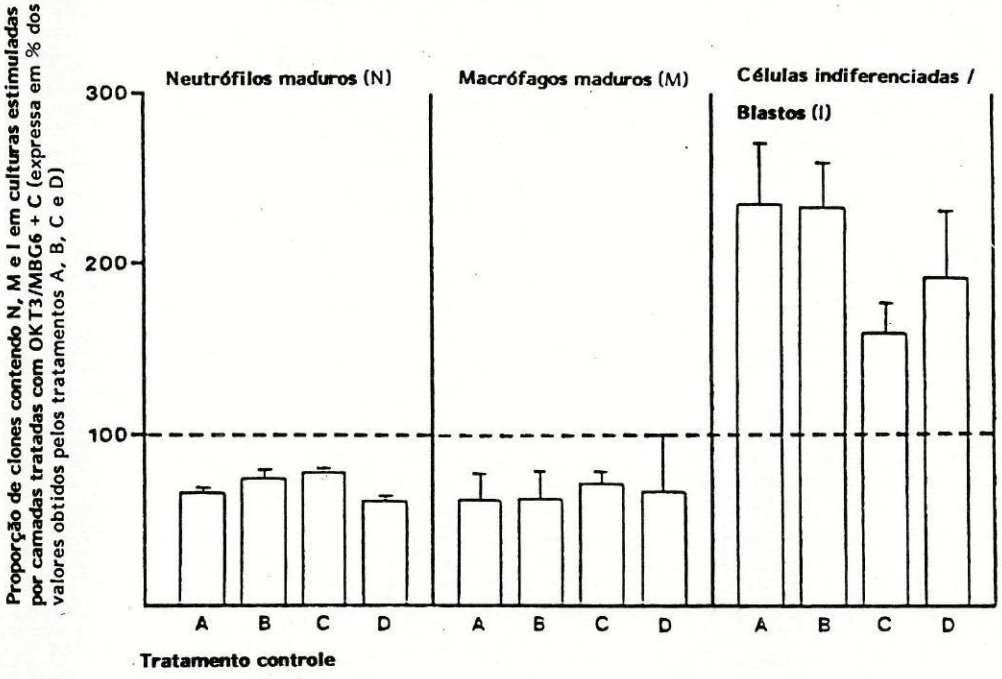


Fig. 5 - Efeito da depleção de células T das camadas nutritivas na maturidade dos clones formados pelas células-alvo. São representadas as percentagens de clones contendo neutrófilos maduros (N), macrófagos (M) e blastos/células indiferenciadas (I) nas culturas estimuladas por camadas tratadas com OKT3/MBG6 + C em comparação com (% de) (A) camadas nutritivas não tratadas, (B) camadas nutritivas tratadas só com anticorpo, só com complemento ou com líquido ascítico irrelevante, (C) camadas nutritivas tratadas com OKT11a + C ou (D) camadas nutritivas tratadas unicamente com OKT3 ou MBG6 e C. A diferença nas proporções de clones contendo N, M e I, entre teste e controle é estatisticamente significativa ("Wilcoxon matched pairs signed ranks test" $p < 0.0001$).

QUADRO II. Eficiência dos anticorpos OKT3 e MBG6 isolados ou em combinação na eliminação de células positivas (citotoxidade mediada pelo complemento)

Células/Anticorpo	OKT3	MBG6	OKT3+MBG6
% cél. fluorescentes antes do C	52.0 ±8.9	59.0 ±3.5	58.0 ±5.3
% cél. fluorescentes pós-C	7.1 ±1.4	7.3 ±1.4	3.3 ±0.8
% sobrevivência de cél. + vas para o Atc	13.4 ±1.4	12.8 ± 5.3	5.5 ± 0.5

Linfócitos periféricos (> 99% de viabilidade) foram incubados com os anticorpos monoclonais OKT3 e/ou MBG6 com ou sem complemento. As células resultantes foram coradas com FITC-Gα M e brometo de etídio de modo a distinguir células mortas das vivas. Em cada experiência calculou-se a percentagem de células que sobreviveu ao tratamento com Atc + C. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão de 3 experiências.

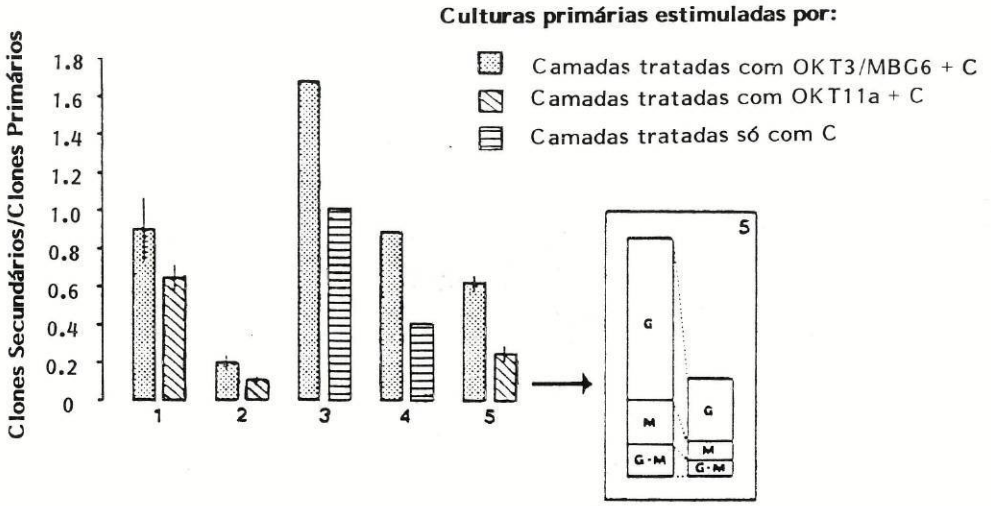


Fig. 6 - Número de clones secundários por clone primário em 5 experiências independentes. Em 2 casos (exp. 3 e 4), clones individuais foram retirados do gel inicial e recultivados; nos restantes casos, camadas superiores inteiras eram ressuspendidas, após contagem de clones, e recultivadas em agar. No painel da direita mostram-se, em aumento, os resultados da experiência 5 classificando-se os clones secundários pelo seu tipo morfológico (G - granulocítico puro; M - monocítico puro; GM - misto granulocítico-monocítico).

QUADRO III. Acção do estímulo gerado pelas camadas nutritivas depletadas de células OKT3/MBG6 positivas sobre o número e tamanho dos clones formados na camada-alvo

	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	
Cam. nutritivas não tratadas	158 ± 26 5.4	170 ± 25 8.7	159 ± 20 13.1	152 ± 4 15.9	148 ± 35 21.8	(a) (b)
Cam. nutritivas depletadas de cél. OKT3/MBG6 +	148 ± 37 5.6	159 ± 12 8.5	141 ± 19 13.2	152 ± 18 19.8	152 ± 26 25.7	(a) (b)
Cam. nutritivas depletadas de cél. OKT11a +	161 ± 33 5.6	159 ± 19 8.6	145 ± 14 11.8	149 ± 15 17.8	141 ± 30 20.3	(a) (b)

(a) Número de clones (média ± erro padrão) formados por 10^4 células semeadas na camada-alvo.
(b) Tamanho médio dos clones (número de células/clone) - média geométrica do número de células contadas em 100 clones consecutivos. Como a distribuição é não-gaussiana, não se dão erros padrão da média.
A concentração de células na camada nutritiva, em qualquer das condições, foi de $10^6.ml^{-1}$.

clones era, no entanto, maior que nos controles a partir do dia 6 de cultura.

Este atraso na diferenciação mieloide era revertido quando se adicionavam às células tratadas com OKT3/MBG6 + C, 10^5 células OKT8 positivas. Nenhum efeito se obtinha se fossem adicionadas 10^5 células OKT4 positivas (Fig. 7).

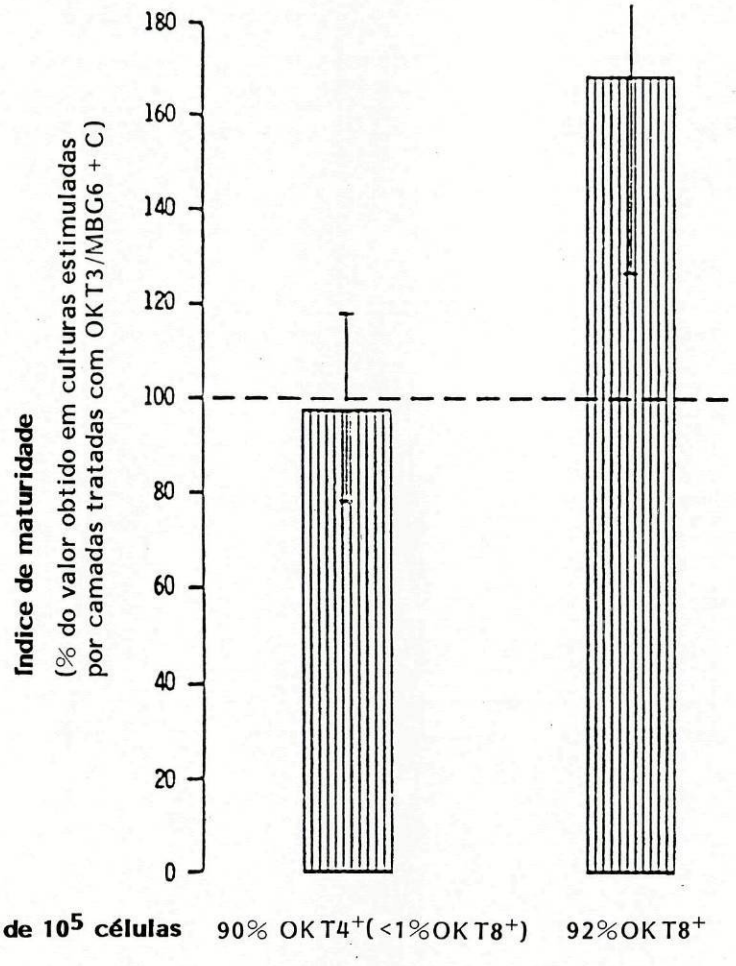


Fig. 7 - Efeito na maturidade dos clones pela adição de 10^5 células (enriquecidas em) OKT4+ ou OKT8+, a camadas depletadas de células OKT3/MBG6+. A fracção T4+ continha 90% de células OKT4+ e < 1% de células OKT8+; a fracção T8 continha 92% de células OKT8+. Os gráficos representam a razão entre o índice de maturidade da condição assinalada e o índice de maturidade das culturas estimuladas por camadas depletadas de células OKT3/MBG6+, sem qualquer adição. Resultados de 3 experiências (média ± erro padrão).

Noutro tipo de experiência, trataram-se células mononucleares com o anticorpo RFT8 (1) e C, e tentou-se estabelecer as características da resposta proliferativa e diferenciante ao estímulo elaborado pela população residual. Em 3 experiências, o nível de remoção de células RFT8 positivas foi efectivo, com percentagens de células T8 residuais variando entre 0 e 2.8 % do total (média - 1.4 %) (Quadro IV). As células mono-

(1) Este anticorpo é semelhante ao anticorpo OKT8, reconhecendo igualmente o antigénio CD8 da subpopulação T supressora/citotóxica, mas é produzido por um clone resultante de fusão efectuada no Departamento de Imunologia do Royal Free Hospital.[278]

QUADRO IV. Viabilidade celular após tratamento com RFT8 ou RFT8 + C

	Células mortas (não viáveis)	Células viáveis RFT8 +vas	Células viáveis RFT8 -vas	Total de cél. viáveis
RFT8 (pré-C)	3.0 ± 0.7%	7.4 ± 6.1%	89.6 ± 4.2%	97.0 ± 0.8%
RFT8 + C	14.5 ± 6.1%	1.4 ± 0.8%	84.1 ± 5.4%	85.5 ± 6.2%

Células mononucleares de sangue periférico foram incubadas com RFT8 e seguidamente com meio de cultura ou com complemento de coelho. Alíquotas dessas células eram coradas com FITC-G αM e BE, como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados representam médias± erros padrão de 3 experiências.

nucleares assim tratadas eram semeadas em concentrações oscilando entre 0 e $1x10^6$ por camada nutritiva (1 ml). Na análise de resultados corrigiram-se as concentrações de células/camada nutritiva, atendendo à percentagem de células viáveis.

Verificou-se que as camadas nutritivas tratadas com RFT8 e C produziam maior incremento do número de clones com o aumento de concentração do que as culturas controle; o tamanho médio dos clones na dose máxima era superior nas culturas estimuladas por camadas "RFT8-depletadas"; e o grau de diferenciação em cultura não aumentava, com o aumento de concentração, na mesma medida que nas culturas estimuladas por camadas controle.

QUADRO V. Regressão de $_n\log$ (B/Y - 1) sobre o número de células na camada nutritiva (entre 0 e $10^6.ml^{-1}$)

	Intercepção (a)	Inclinação (b)	Coeficiente de correlação (r)	
RFT8 + C	2.43	-5.86	-0.9355	n = 10 p < 0.001
Só RFT8	1.94	-2.33	-0.9140	
Só C	1.92	-3.33	-0.8632	
OKT3/MBG6 sem C	2.09	-2.63	-0.9298	
TODOS OS CONTROLES	1.98	-2.94	-0.8529	n = 20 p < 0.001

Foi usada a transformação $_n\log$ (B/Y-1), em que B é o número máximo de clones formados (estimativa a partir de culturas maximamente estimuladas por camadas nutritivas de 10^6 leucócitos periféricos) e Y o número de clones formados para cada concentração de células na camada nutritiva. O quadro mostra os valores da inclinação, intercepção e coeficiente de correlação da regressão linear dessa transformação (Y) para diferentes concentrações de células (X), para a condição RFT8 + C e controles.
O reforço proliferativo obtido pelo estímulo produzido pelas camadas nutritivas RFT8 + C pode ser medido pela razão das respectivas inclinações:

b (RFT8 + C) : b (só RFT8) = 2.51
b (RFT8 + C) : b (só C) = 1.76
b (RFT8 + C) : b (todos os controles) = 2.00

Para avaliação do estímulo proliferativo, compararam-se as curvas resultantes da transformação $_n\log$ (B/Y-1) do número de clones obtidos para as diferentes concentrações de células nas camadas nutritivas "teste" (células tratadas com RFT8 + C) e controle (só RFT8; só C; OKT3/MBG6 sem C). A razão das inclinações da condição RFT8 + C e controle dá a medida do reforço proliferativo obtido (Quadro V).

Também nas culturas estimuladas por camadas "RFT8-depletadas" o tamanho dos clones era maior. A média geométrica do número de células por clone era de 8.56 para a condição RFT8 + C, 6.42 para RFT8 isolado e 5.64 para C isolado.

Por outro lado, a diferenciação *in vitro* diminuia nas culturas estimuladas por camadas "RFT8-depletadas". A curva dose-resposta, transformação logarítmica do índice de maturidade (log IM 1) contra concentração de células/camada nutritiva, apresenta inclinação inferior para as camadas-teste em relação às camadas-controle, denotando menor incremento de maturidade dos clones com o aumento de dose (Quadro VI).

QUADRO VI. Regressão do log IM1 sobre o número de células na camada nutritiva (entre 0 e $1.0^6.ml^{-1}$)

A - Dia 5	Intercepção (a)	Inclinação (b)	Coeficiente de correlação (r)	
RFT8 + C	-0.19	0.25	0.8621	n = 10 p < 0.01
Só RFT8	-0.20	0.32	0.8407	
Só C	-0.16	0.29	0.9481	
OKT3/MBG6 sem C	-0.19	0.35	0.9202	
TODOS OS CONTROLES	-0.18	0.32	0.8911	n = 15 p < 0.001
B - Dia 7				
RFT8 + C	-0.02	1.04	0.8995	n = 5 p < 0.05
Só C	-0.02	1.36	0.9424	n = 5 p < 0.05

Regressão linear da transformação logarítmica do I.M.1 sobre a concentração de células na camada nutritiva para a condição RFT8 + C e condições-controle (avaliação da maturidade nos dias 5 - A - e 7 - B - de cultura).
Dia 5 - b (RFT8 + C) : b (Todos os controles) = 0.78
Dia 7 - b (RFT8 + C) : b (Só C) = 0.76

Na fig.8 representa-se a relação proliferação/diferenciação com o estímulo gerado por células mononucleares depletadas de células RFT8 positivas, comparativamente ao estímulo normal (camadas nutritivas controle). No eixo dos Y está representada a

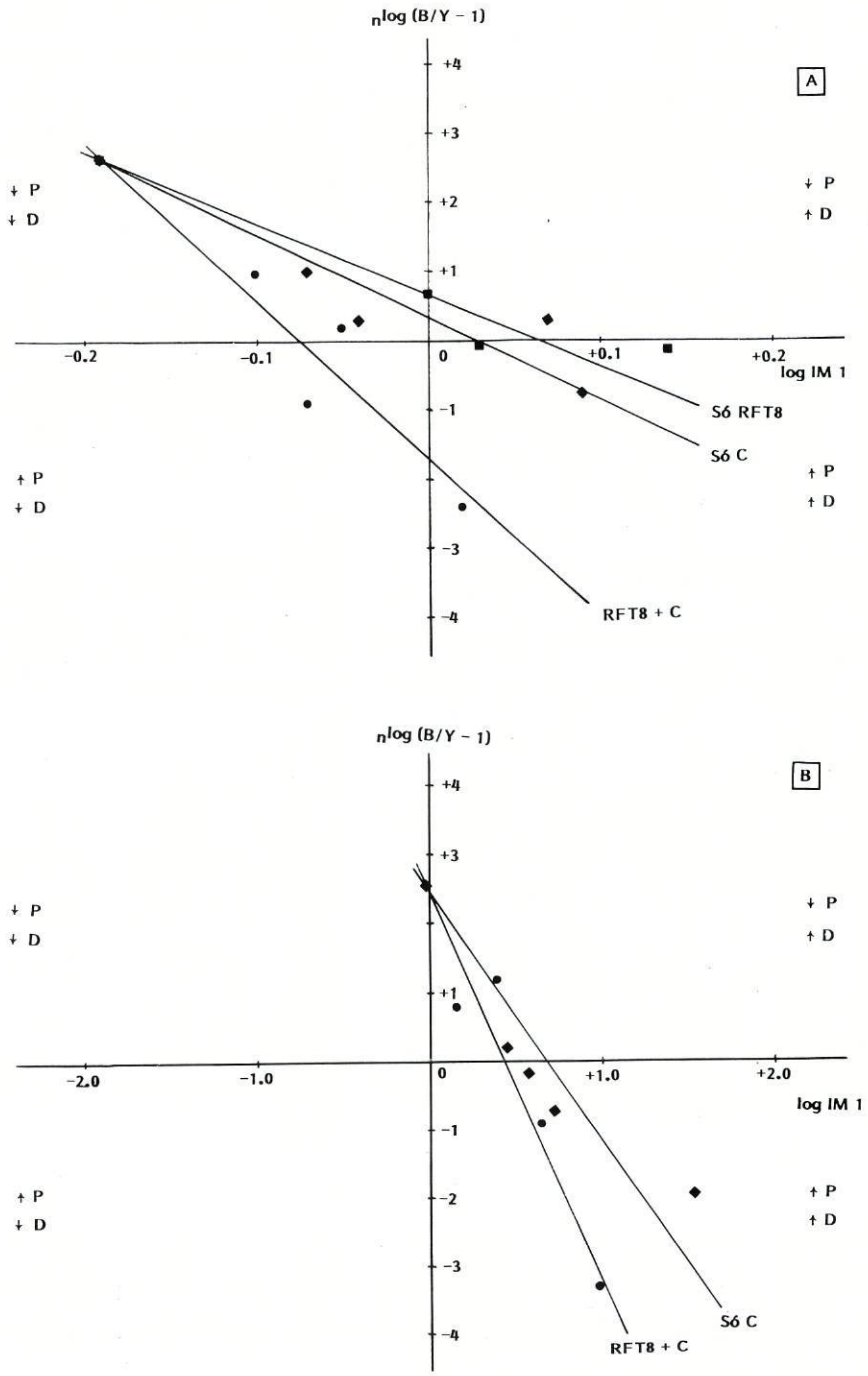


Fig. 8 - Representação do equilíbrio proliferação/diferenciação em culturas estimuladas por células mononucleares depletadas de células RFT8+ (●) ou por células mononucleares tratadas só com RFT8 (■) ou só com C (◆). O eixo dos X representa a resposta diferenciante (log IM) e o eixo dos Y a resposta proliferativa ($_n$log (B/Y-1) - valores negativos traduzem uma maior resposta proliferativa). (A) Culturas de 5 dias, (B) culturas de 7 dias. Existe, em qualquer das condições e pontos-tempo estudados, uma correlação negativa significativa entre os valores de $_n$log (B/Y-1) e os de log IM; ou seja, com um dado estímulo há uma correlação positiva entre proliferação e diferenciação, embora as magnitudes relativas de uma e outra variem com o tipo de estímulo utilizado.

resposta proliferativa (valores negativos correspondem a uma maior resposta proliferativa e vice-versa) e no eixo dos X a resposta diferenciante. A curva de resposta de progenitores normais ao estímulo fornecido por camadas "RFT8-depletadas" está desviada para baixo e para a esquerda em relação à curva de resposta aos estímulos de camadas--controle, os quais cruzam os eixos acima e à direita da intersecção destes, tanto em culturas de 5 dias como em culturas de 7 dias. Isto sugere que as camadas depletadas de células RFT8 positivas produzem um estímulo proliferativo mais forte e menos diferenciante que as camadas controle.

Diferentes subpopulações de células mononucleares de sangue periférico produzem estímulos qualitativamente diferentes

3 - RESPOSTA DE PROGENITORES LEUCÊMICOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GM-CSA

O GM-CSA estimula, assim, tanto a proliferação como a diferenciação de progenitores mieloides normais. A resposta proliferativa destas células ao CSA pode ser linearizada pela transformação $_n\log (B/Y-1)$, em que Y é o número de clones formados a determinada concentração de GM-CSA e B o número de clones para a estimulação máxima (camadas nutritivas de $1x10^6$ células de S.P..ml^{-1}).[239] A resposta diferenciante pode ser igualmente medida pela transformação log IM 1 que é linear em grande parte da curva (ver Ponto 1 de Resultados).

A resposta proliferativa de progenitores leucémicos ao GM-CSA foi anteriormente estudada.[175,176] No presente estudo, decidiu-se analisar a resposta diferenciante dos progenitores leucémicos, utilizando o mesmo sistema usado para os progenitores mieloides normais, e compará-la com a respectiva resposta proliferativa. Em 8 casos, células de leucemia aguda mieloblástica (LAM) foram cultivadas tendo como estímulo diferentes concentrações de células mononucleares produtoras de CSF (de 0 a $1x10^6$ cél . ml^{-1}) e a diferenciação morfológica atingida em cultura ao fim de 7 dias foi comparada com a de uma população-referência (células de LMC conservadas em N_2 líquido) com diferenciação *in vitro* aproximadamente normal (Ponto 1 de Resultados). Células de medula normal foram também usadas como controle em cada experiência, mas as células de LMC propiciam melhor padronização para comparação das respostas. Detalhes acerca dos 8 doentes são fornecidos no Quadro I.

Como se pode ver pela fig. 9, as células de LAM respondiam diferenciando-se ao aumento de concentração de GM-CSA exógeno (medido pelo número de células mono-

nucleares presentes na camada nutritiva) e em cada um dos 8 casos a curva de resposta tem inclinação positiva, embora em 3 casos (D, E e G) o intervalo do confiança de 95% se estenda até valores negativos (Quadro VII). Pode assim concluir-se que, em pelo menos 5 dos 8 casos, houve uma resposta significativa ao estímulo diferenciante exógeno. O padrão de resposta varia de caso para caso, mas em todos os casos excepto um (doente H), a diferenciação das células leucémicas, mesmo em condições de estimulação máxima, ficou aquém do nível de diferenciação atingido pelas células-referência com a mesma dose de estímulo. No referido caso H, verificou-se na análise de resultados (tratava-se de um estudo cego), que as células testadas não tinham sido colhidas na altura do diagnóstico, mas na fase regenerativa após ciclo de quimioterapia que conduziu a doente a um período de remissão parcial (menos de 5% de blastos, embora com manutenção de características displásticas da medula). Neste caso H, as curvas das células-teste e das células-referência são praticamente sobreponíveis, sugerindo que as células cultivadas seriam provavelmente células regenerativas normais.

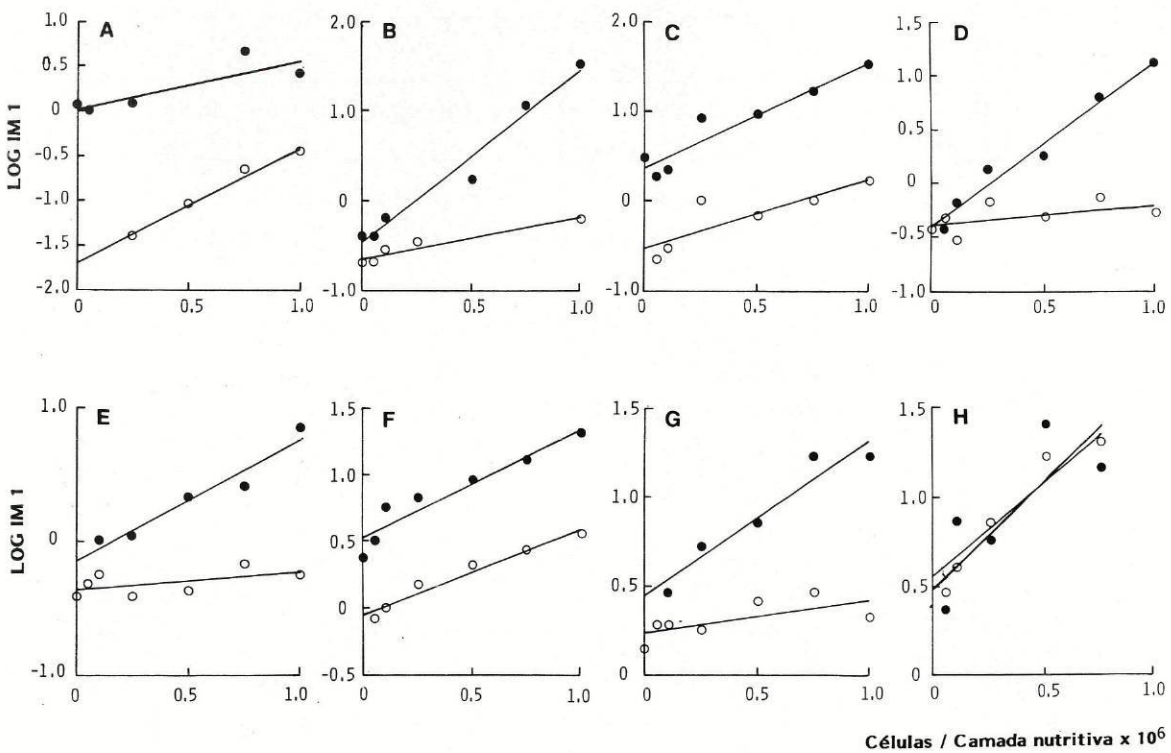


Fig. 9 - Curvas dose-resposta diferenciante. Em cada caso, a resposta das células de doentes com L.A.M. (o) é comparada com a das células-referência (alíquotas de células de LMC criopreservadas em N_2 líquido) (•). Em todos os casos, as células de LAM exibiam uma resposta maturativa, como é indicado pela inclinação positiva. As percentagens máximas de clones contendo células maduras variavam entre 26% e 78% para as culturas-teste (A-G) e entre 82% e 97% para as culturas-referência. No caso H esse valor era 95%. Os valores da inclinação e intercepção para a regressão do log IM 1 das diferentes células-teste de LAM são dados no Quadro VII.

QUADRO VII. Características em cultura e análise dose-resposta (diferenciação)

Doente	Padrão de cultura	Clones/10^5 cél.	Inclinação (fig. 7)	i.c. 95%	Intercepção (fig. 7)	I.M. basal	I.M. máximo	I.M. *in vivo*
A	Macrocluster borderline	683	1.28 ± 0.12	+0.79/ +1.78	-1.70	0.02	0.11	0.03
B	Microcluster	668	0.46 ± 0.09	+0.19/ +0.74	-0.65	0.55	0.06	0.25
C	Microcluster	1969	0.77 ± 0.23	+0.13/ +1.41	-0.53	0.12	0.05	0.02
D	Microcluster	802	0.20 ± 0.15	-0.19/ +0.58	-0.40	1.01	0.05	2.31
E	Microcluster	857	0.13 ± 0.09	-0.09/ +0.36	-0.36	0.61	0.10	0.01
F	Macrocluster borderline	144	0.64 ± 0.06	+0.46/ +0.81	-0.05	0.27	0.18	2.00
G	Macrocluster	5178	0.19 ± 0.09	-0.05/ +0.42	+0.24	0.62	0.13	0.05
H	Colónia	1563	1.22 ± 0.19	+0.62/ +1.78	+0.48	0.64	1.58	-

A inclinação e a intercepção referem-se à regressão linear do log I.M. das células-teste (fig. 7); i.c. 95% - intervalo de confiança de 95%.
Os I.M. basal e máximo são calculados a partir dos valores da regressão do log I.M. a 0 e 10^6 células.ml^{-1} por camada nutritiva, respectivamente, e expressos num quociente teste: referência.
O I.M. *in vivo* representa a razão da percentagem de células mais maduras que promielócitos/promonócitos pela percentagem de blastos + promielócitos/promonócitos, na medula utilizada para cultura.

Para cada doente, determinou-se na medula colhida um índice de maturidade que foi designado por índice de maturidade *in vivo* (IM *in vivo*). Este índice era calculado a partir da contagem diferencial efectuada, por observador alheio, na amostra usada para cultura, dividindo o número de neutrófilos, monócitos, metamielócitos e mielócitos pelo número de blastos, promielócitos e/ou promonócitos. A distinção assim feita entre células maduras e imaturas é posicionada arbitrariamente, mas cortes a outros níveis davam resultados paralelos. Nos casos A, C, E e G, a diferenciação *in vivo* era desprezível e só os casos D e F (RAEB-T e M2 secundária a RAEB (1)) tinham um IM *in vivo* relativamente alto (fig. 10). Como era óbvio, investigou-se se esta maior diferenciação *in vivo* correspondia a maior diferenciação *in vitro*. No caso D, observou-se efectivamente uma particularmente boa diferenciação basal, isto é, sem adição de estímulo exógeno, o que sugere que ela podia ser devida à presença de actividade diferenciante endógena na própria medula leucémica. Já no caso F, o IM basal era relativamente baixo, mas

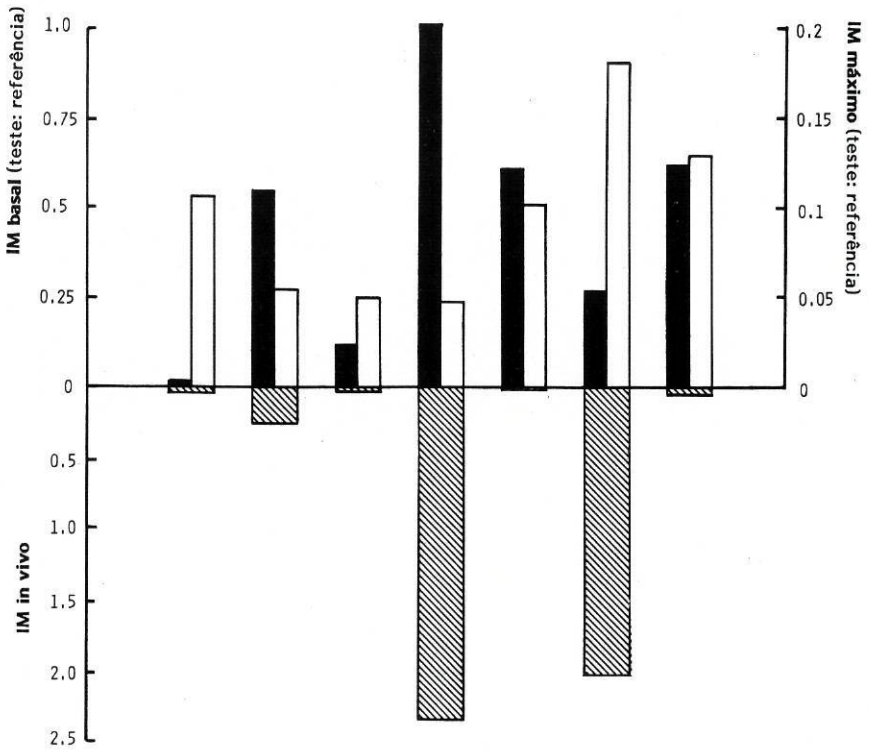


Fig. 10 - Comparação entre os índices de maturidade *in vivo* e *in vitro* (doentes A-G da esquerda para a direita). O painel superior mostra os índices de maturidade "basal" (só estimulação endógena) e "máximo", os quais foram calculados a partir dos valores da regressão do log IM, a 0 e 10^6 células por camada nutritiva, respectivamente, em culturas de 7 dias. Estes índices de maturidade são expressos, em cada caso, em relação às células-referência (razão IM teste/IM referência). O IM "basal" é representado pelas colunas a preto e o IM "máximo" pelas colunas a branco ou não preenchidas. O painel inferior mostra o IM *in vivo* que é calculado a partir de contagem diferencial nas medulas usadas para cultura (IM *in vivo* = neutrófilos + monócitos + metamielócitos + mielócitos: blastos + promielócitos e/ou promonócitos).

(1) RAEB, "refractory anaemia with excess of blasts"; RAEB-T, "refractory anaemia with excess of blasts in transformation";[277] M2, leucemia aguda mieloblástica com diferenciação, classificação FAB.[276]

a diferenciação máxima atingida com estímulo exógeno (IM máximo) foi a mais alta de todos os casos estudados, o que demonstra boa sensibilidade das suas células a esse estímulo.

Células de leucemia aguda mieloblástica respondem ao GM-CSA com aumento de diferenciação morfológica: a resposta é dose-dependente e variável de caso para caso

4 - RELAÇÃO ENTRE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS LEUCÉMICAS

A razão das inclinações da curva do teste e da curva da referência foi expressa como factor de sensibilidade ao estímulo diferenciante, "differentiation-sensitivity factor" (**D-SF**) e calculada nos 7 casos analisados na altura do diagnóstico. Embora não se observe correlação estreita entre os valores de D-SF e a obtenção e duração de remissão completa, não se pode deixar de notar que, entre os 3 casos com D-SF mais alto, se encontram os doentes (A e C) que obtiveram remissões mais prolongadas (> 85 meses e > 33 meses) (1) (Fig. 11 e Quadro VIII). Nestes 2 doentes (assim como no doente F) o D-SF é inclusivamente mais alto que o **P-SF** ("proliferation-sensitivity factor"), calculado de forma análoga no que respeita à resposta proliferativa (razões D-SF: P-SF de 3.6 e 1.7, respectivamente para os doentes A e C).

A resposta proliferativa das células leucémicas era também anormal, como se pode ver no Quadro VII. O padrão de crescimento em cultura dos 7 casos testados na apresentação variou entre o tipo de "macroclusters" (clones grandes mas sem atingir dimensões de colónias) e o tipo de "microclusters" (pequenos clones). Estes padrões de crescimento neste sistema de cultura, com ausência de formação de colónias, são típicos de células leucémicas[171,173] e sugerem que a presença de células normais residuais (que normalmente formariam colónias) é escassa e o seu crescimento irrelevante. O número de clones formados por 10^5 células era extremamente variável (entre 144 e 5178). A resposta clonogénica ao CSA, medida pelo atrás referido P-SF (2), só num

---

(1) Os tempos de remissão foram actualizados em Outubro de 1985, em data posterior, portanto, à publicação do artigo.

(2) O valor de P-SF é dado pela razão entre o nível de CSA necessário para estimular 50% das células-teste e o nível de CSA necessário para estimular 50% das células-controle a formar clones.[175] Neste estudo, o P-SF é definido como o recíproco deste valor para facilitar a comparação com o D-SF. Assim, valores de P-SF superiores à unidade indicam uma superior resposta clonogénica das células-teste em relação às células-referência e vice-versa.

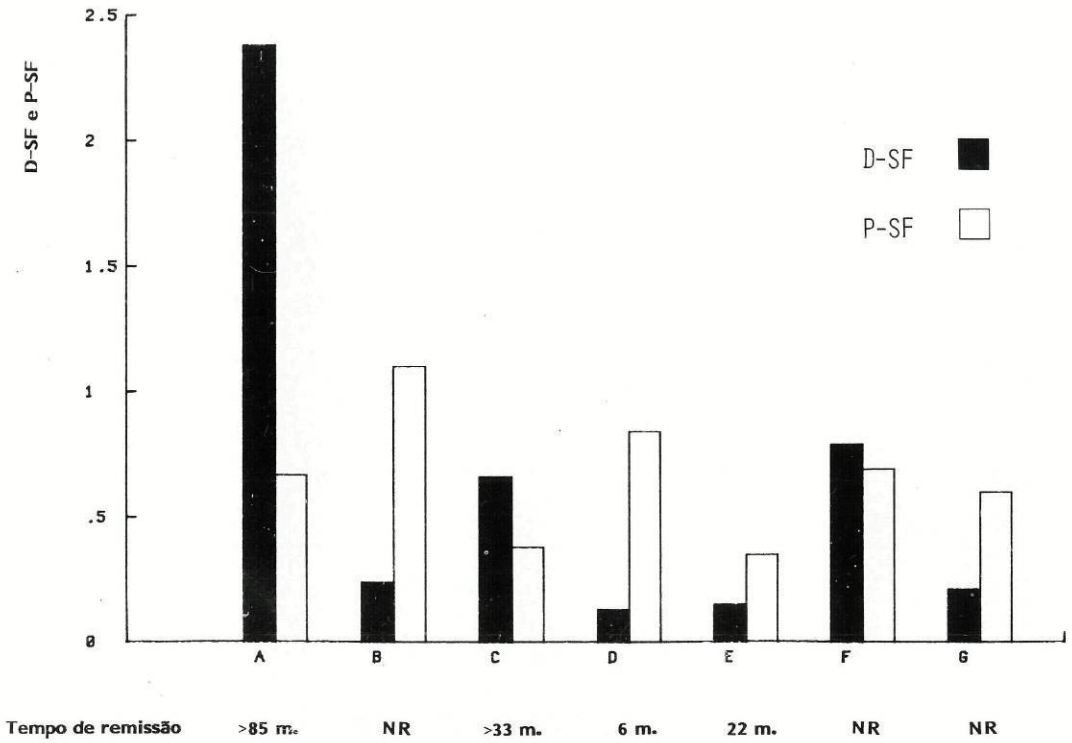


Fig. 11 - "Differentiation-sensitivity factor, D-SF" (colunas preenchidas) e "proliferation--sensitivity factor, P-SF" (colunas a branco), dos doentes A-G. Não existia diferença significativa entre os 4 doentes que entraram e os 3 que não entraram em remissão completa (NR), embora os doentes A e C que apresentavam os tempos de remissão mais prolongados (> 85 e > 33 meses, respectivamente) tivessem uma razão D-SF/P-SF excepcionalmente alta (A - 3.55 e C - 1.74). O D-SF e o P-SF foram calculados a partir das respostas diferenciante e proliferativa ao CSA, do teste e referência, em culturas de 7 dias. Só são representados os doentes analisados na altura da apresentação.

QUADRO VIII. Relação entre a sensibilidade ao estímulo proliferativo e a sensibilidade ao estímulo diferenciante em doentes com leucemia aguda mieloblástica

Doente	P/SF	D/SF	Razão D/SF:P/SF
A	0.67	2.38	3.55
B	1.10	0.30	0.27
C	0.38	0.66	1.74
D	0.84	0.15	0.18
E	0.35	0.18	0.51
F	0.69	0.83	1.20
G	0.60	0.21	0.35
H	2.49	1.37	0.55

P/SF e D/SF = inclinação da curva teste: inclinação da curva referência, em cada medula leucémica testada para a resposta ao estímulo proliferativo e ao estímulo diferenciante, respectivamente.
O valor de P/SF para o doente H está provavelmente de acordo com o carácter regenerativo das suas células (ver texto). Numa medula em recuperação, é normal que o estímulo à proliferação seja forte de modo a preencher o vazio deixado pela quimioterapia. No entanto, as células deste doente também têm um D/SF > 1 (a sua curva de resposta diferenciante é quase sobreponível à das células-referência).

dos 7 casos testados é superior a 1, isto é, só as células do doente B eram mais sensíveis ao estímulo proliferativo que as células-referência. Em todos os outros casos a resposta proliferativa é inferior ao controle, sendo especialmente baixa nos casos C e E.

Não só a capacidade de diferenciação das células leucémicas está alterada, como também a sua sensibilidade ao estímulo proliferativo é anormal. As respostas proliferativa e diferenciante são variáveis de doente para doente e variam independentemente uma da outra no mesmo doente

5 - DETECÇÃO DE ACTIVIDADE DIFERENCIANTE ENDÓGENA EM MEDULAS LEUCÉMICAS

Para testar a hipótese de que a medula leucémica produz, ela própria, um estímulo para a diferenciação das células leucémicas foi realizado outro tipo de experiência. Seguindo os mesmos princípios da resposta ao estímulo exógeno, fez-se variar a concentração de células medulares na camada superior. Usaram-se duas concentrações de células-alvo (0.5 e 2.0 x 10^5 cél.ml^{-1}). Assim, caso houvesse estímulo endógeno a curva obtida para a concentração de $2.0x10^5$ cél.ml^{-1} devia estar deslocada em relação à curva obtida para a concentração de $0.5x10^5$ cél.ml^{-1} situando-se superiormente a (ou à esquerda de) esta. A distância do deslocamento de uma curva em relação à outra dependeria deste estímulo adicional e permitiria eventualmente medi-lo.

Em 2 medulas testadas, uma do doente E (apresentação) e a outra do doente H (em fase regenerativa pós-quimioterapia) verificou-se haver deslocamento paralelo, para cima e para a esquerda, da regressão a $2.0x10^5$ cél.ml^{-1} em relação à regressão a $0.5x10^5$ cél.ml^{-1}, o que traduz a existência de um estímulo diferenciante endógeno (fig. 12). O estímulo produzido pelas extra $1.5x10^5$ células era equivalente ao estímulo fornecido por 0.64 e $0.34x10^6$ células mononucleares da camada nutritiva, respectivamente para os doentes E e H. Em ambos os casos não havia desvio significativo do paralelismo, o que indica que o estímulo exógeno tem características dose-resposta idênticas ao estímulo exógeno. Por outro lado, esta experiência sugere que o grau de diferenciação evidenciado *in vivo* poderá estar ligado à existência de maior ou menor quantidade de estímulo diferenciante endógeno na medula leucémica.

A medula leucémica pode ter uma actividade diferenciante endógena, susceptível de ser medida

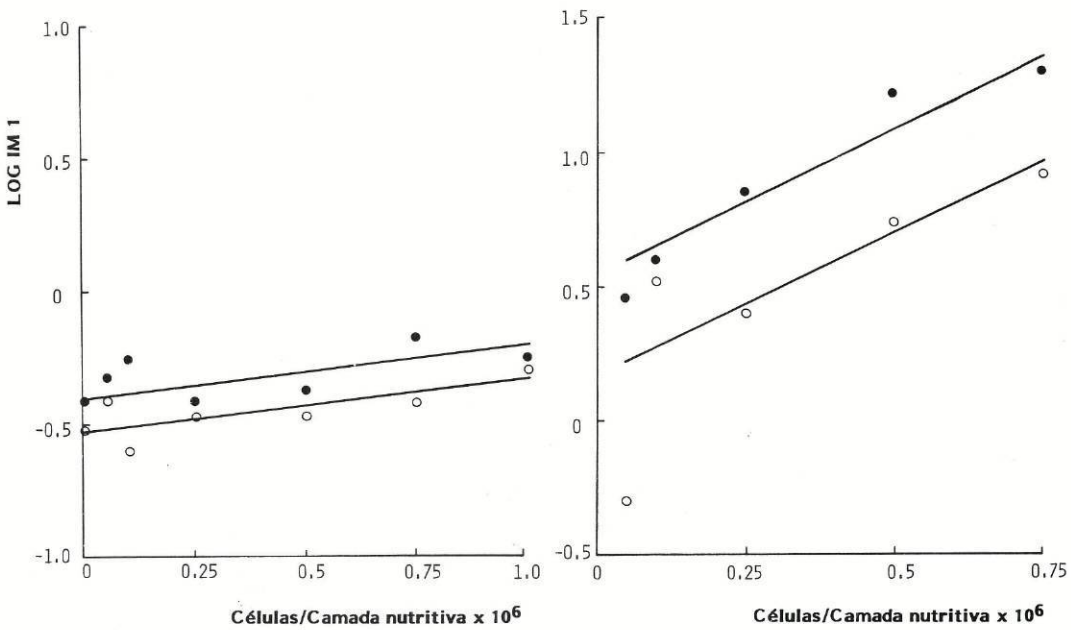


Fig. 12 - Para detectar a presença de possível actividade diferenciante endógena nas medulas leucémicas testaram-se duas amostras de (a) medula do doente E com LAM e (b) medula do doente H em período regenerativo após quimioterapia. Analisaram-se curvas dose-resposta com duas concentrações diferentes de medula óssea ($2x10^5$ (•) e 0.5×10^5 (o) células por camada superior).
Era previsível que no caso de existir um estímulo diferenciante endógeno, se notaria um desvio da curva representativa das culturas com maior concentração de células-alvo devido ao estímulo adicional fornecido por essas células. As duas regressões seriam paralelas se os estímulos endógeno e exógeno tivessem a mesma relação dose-resposta. Em ambos os casos examinados, a regressão do log IM 1 contra a concentração de células na camada nutritiva, a $2x10^5$ células na camada superior, apresentava-se à esquerda e acima da regressão a $0.5x10^5$ células e não havia desvio significativo do paralelismo. A distância entre as duas regressões mede o estímulo adicional fornecido pelas $1.5x10^5$ células suplementares. Esse estímulo é equivalente ao estímulo gerado por 0.64 e $0.34x10^6$ leucócitos mononucleares da camada nutritiva, respectivamente para os doentes E e H. Todos os cálculos foram feitos a partir do exame de culturas de 7 dias.

6 - RESPOSTA DE CÉLULAS NORMAIS E LEUCÉMICAS A AGENTES INDUTORES DE DIFERENCIAÇÃO

Além do estimulante fisiológico GM-CSF (ou da sua actividade diferenciante), numerosos outros compostos são capazes de induzir a diferenciação de células leucémicas. Entre estes encontram-se inibidores da síntese de ADN (como citosina-arabinosídeo, ARA-C,[230,279,213,218] afidicolina, APH,[218] 6-tioguanina, 6-TG, 6-mercaptopurina, 6-MP[212,280]), análogos vitamínicos (vit. D3, 1,25-dihidroxicolecalciferol;[222-224] vit. A, ácido retinoico 13-cis e all-trans[211]) e compostos plano-polares (dimetilsulfóxido,

DMSO,[208,210] dimetilformamida, DMF,[210] N-metilformamida, N-MF, hexametilbisacetamida, HMBA[212]).

Tentou-se estudar a resposta de células normais e leucémicas a alguns destes agentes (e possíveis interacções entre estes). Para avaliar o grau de diferenciação *in vitro* usaram-se diversos parâmetros:

- maturidade das células componentes de clones em culturas de agar, avaliada por um índice de maturidade;
- avaliação da maturidade de células em culturas de suspensão (morfológica, citoquímica - dupla esterase - e funcional - redução do nitroazultetrazólio);
- avaliação do potencial proliferativo de células progenitoras presentes em culturas de suspensão, através da recultura destas células em agar.

A fig. 13 mostra a percentagem de células da linha celular leucémica HL60 com capacidade de reduzir o nitroazultetrazólio (NAT) quando expostas a concentrações crescentes de diferentes retinoides.

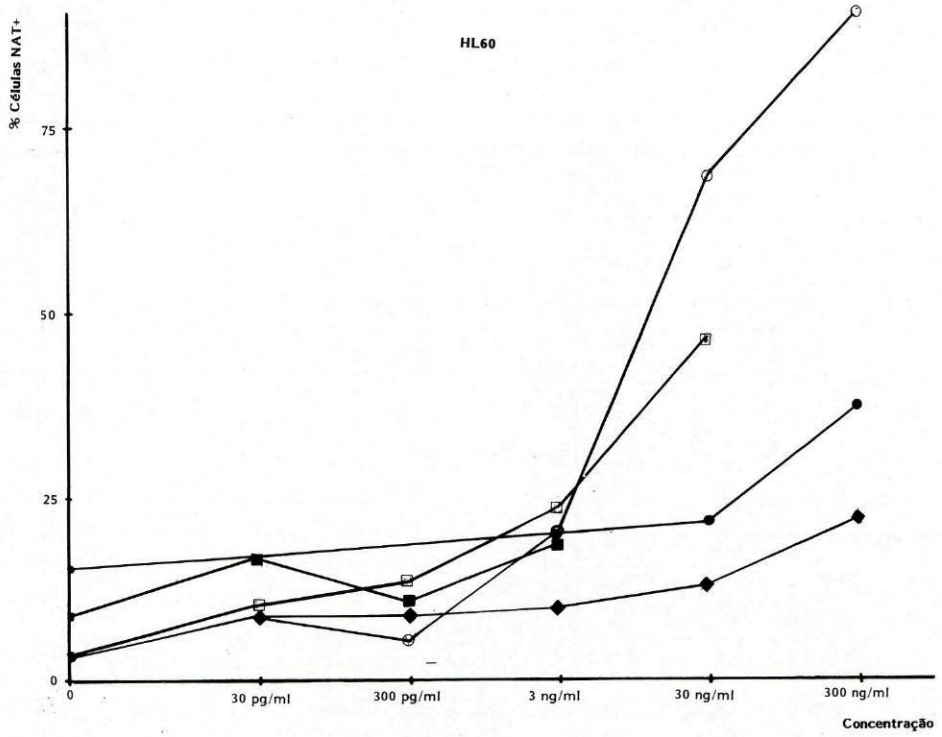


Fig. 13 - Percentagem de células com capacidade de reduzir o nitroazultetrazólio (NAT) em culturas líquidas da linha celular HL60 na presença de concentrações seriadas de 5 retinoides: all-trans (o) e 13-cis ácido retinoico (□), etretinato (◆), etretina (●) e RO 13-6298 (■). A incubação com o retinoide era de 5 dias.

Na fig. 14 mostra-se o decréscimo em células clonogénicas, do dia 0 para o dia 6, em culturas de suspensão, no caso de um doente mielodisplásico (SMD). O número de células clonogénicas (por 10^5 células) diminuia com o tempo: a menor diminuição observava-se na ausência de estímulo exógeno (só presente CSA endógeno); a adição de estímulo exógeno (PHA-LCM), embora aumentasse a proliferação em suspensão (1), diminuia a proporção de células clonogénicas em relação ao número total de células (-26.9%); a exposição a concentrações até 10^{-5}M de 6-MP não era significativamente diferente do controle; 10^{-4}M 6-MP reduzia o número de células clonogénicas, ao 6º dia das culturas de suspensão (C.S.), para 25.5% do controle.

Este efeito não parece ser, neste caso, um efeito citotóxico com perda de viabilidade celular, mas sim um efeito diferenciante, já que nas culturas primárias a mesma concentração de 6-MP (10^{-4}M) só causava abaixamento discreto na formação de clones (86.9% do controle, neste particular caso).

Por outro lado, a percentagem de células capazes, no dia 6 das C.S., de reduzir o NAT subia de 17.4 ± 1.7% no controle para 37.8 ±2.2% nas culturas contendo 0.1 mM de 6-MP.

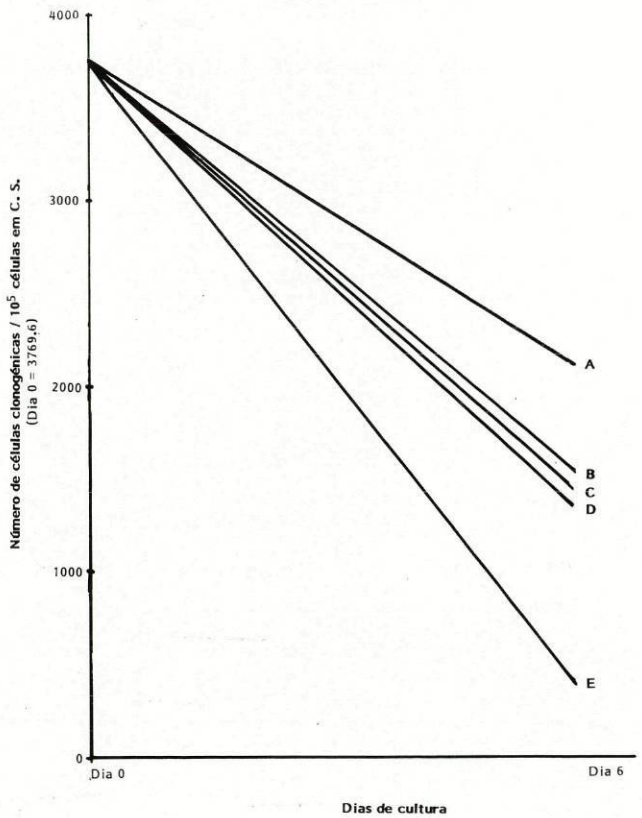


Fig. 14 - Decréscimo de células clonogénicas em culturas de suspensão, num doente com síndrome mielodisplásico, entre os dias 0 e 6 de cultura. Representa-se o número de células clonogénicas por 10^5 células. (A) refere-se a culturas estimuladas apenas por estímulo endógeno, (B), (C), (D) e (E) a culturas estimuladas por 5% PHA-LCM, na presença de 0, 10^{-6}M, 10^{-5}M e 10^{-4}M de 6-MP, respectivamente.

(1) Há 40.4% mais células nas culturas de suspensão estimuladas por PHA-LCM do que nas culturas sem estímulo exógeno.

Progenitores normais e leucémicos respondem a agentes indutores de diferenciação desenvolvendo características morfológicas e funcionais associadas à diferenciação celular e perdendo potencial proliferativo

7 - PESQUISA DE INTERACÇÕES SINERGÍSTICAS ENTRE DIFERENTES INDUTORES DE DIFERENCIAÇÃO

Procurou-se seguidamente testar combinações de agentes indutores de diferenciação em células leucémicas e normais, para avaliar de possíveis interacções sinergísticas ou antagonísticas. Para isso, dividiram-se os indutores em 2 grupos principais: agentes com acção conhecida de bloqueio da síntese de ADN, como a 6-MP, a 6-TG, o ARA-C e a APH; e outros agentes indutores, como o ácido retinoico (RET) e a N-MF.

Na fig. 15, mostram-se os resultados da combinação 6-MP + N-MF, num doente com SMD (RAEB). Nela pode ver-se que o número de células em culturas de suspensão (6º dia) capazes de reduzir o NAT ou com positividade esterásica era superior nas culturas contendo 10^{-5}M 6-MP + $3x10^{-2}$M N-MF do que em culturas contendo concentrações 10 vezes superiores de qualquer uma das drogas em separado. O mesmo acontecia com a combinação 6-MP + RET. Efeito comparável ou superior (respectivamente na percentagem de células NAT positivas e na percentagem de células esterase positivas) ao das

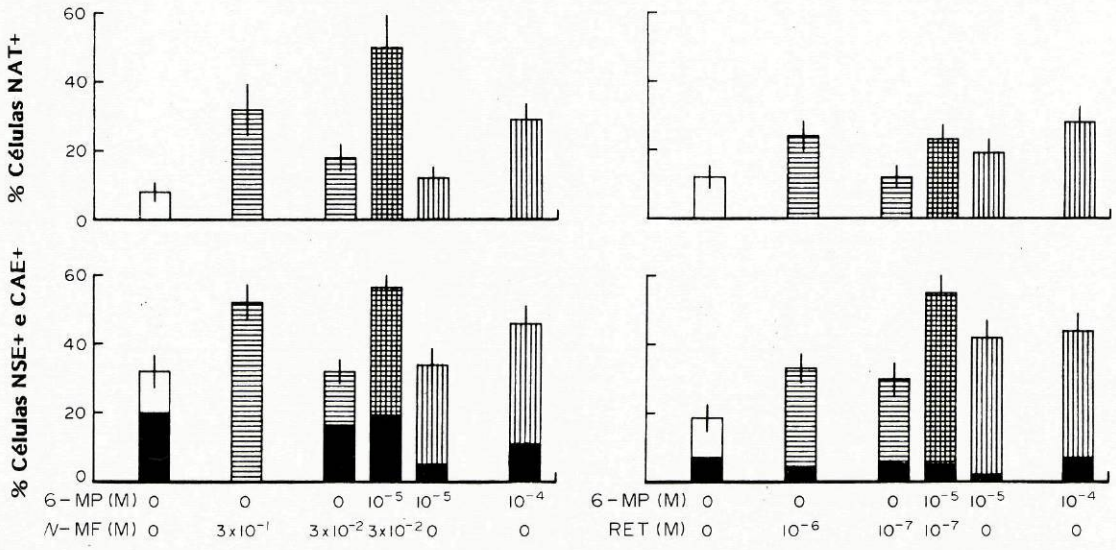


Fig. 15 - Efeito indutor de diferenciação, num doente com síndrome mielodisplásico, das combinações 6-MP/N-MF e 6-MP/RET em diferentes concentrações de cada um dos agentes. A diferenciação era monitorizada pela redução do NAT e pela dupla esterase, em culturas de suspensão de 6 dias. Na coloração da dupla esterase, só se contaram células fortemente positivas e as células NSE+ são representadas pela fracção preta das colunas, correspondendo a parte restante a células CAE+. Nenhum dos 3 agentes produziu, nas concentrações usadas, redução significativa do número de células nucleadas.

concentrações de 10^{-4}M 6-MP ou 10^{-6}M RET, usados em separado, foi obtido com a combinação de 10^{-5}M 6-MP + 10^{-7}M RET.

A fig. 16 mostra mais 4 casos (2 SMD, 1 LAM e 1 normal) em que diversas combinações de 6-MP e N-MF foram testadas, reforçando a evidência apresentada na fig. 13. Que o sinergismo não é exclusivo de combinações incluindo 6-MP, vê-se na fig. 17, em

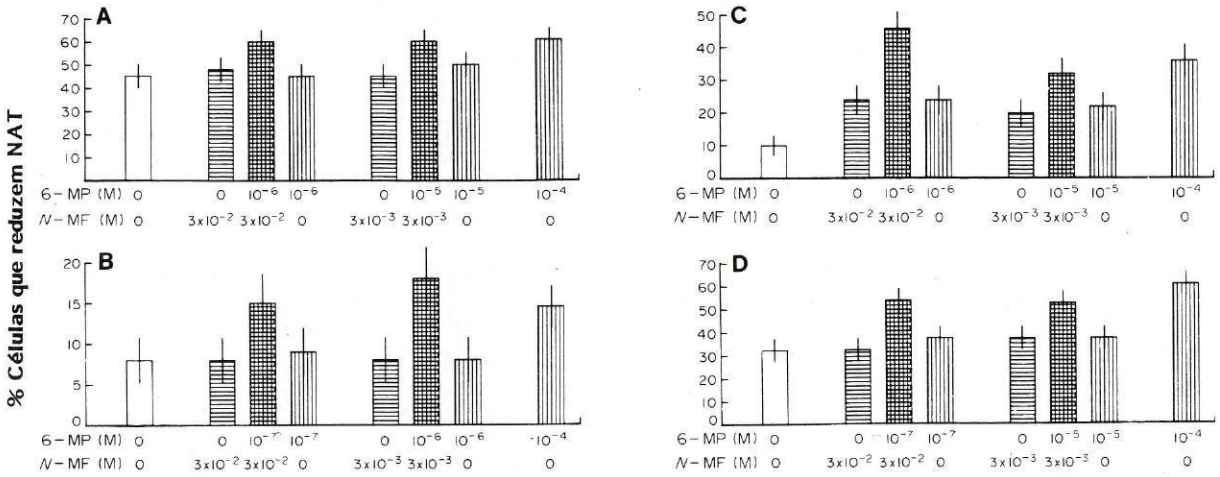


Fig. 16 - Resposta sinergística da combinação 6-MP/N-MF, como pode ser avaliado pelo teste da redução do NAT em culturas de suspensão de 6 dias de células de dadores com (A) SMD (leucemia mielomonocítica crónica), (B) SMD (RAEB-T), (C) voluntário normal e (D) LAM (M4). Notava-se uma redução em células nucleadas de 16.0 ±6.5% com $3x10^{-1}$M N-MF e de 21.0 ± 12.5% com 10^{-4}M 6-MP.

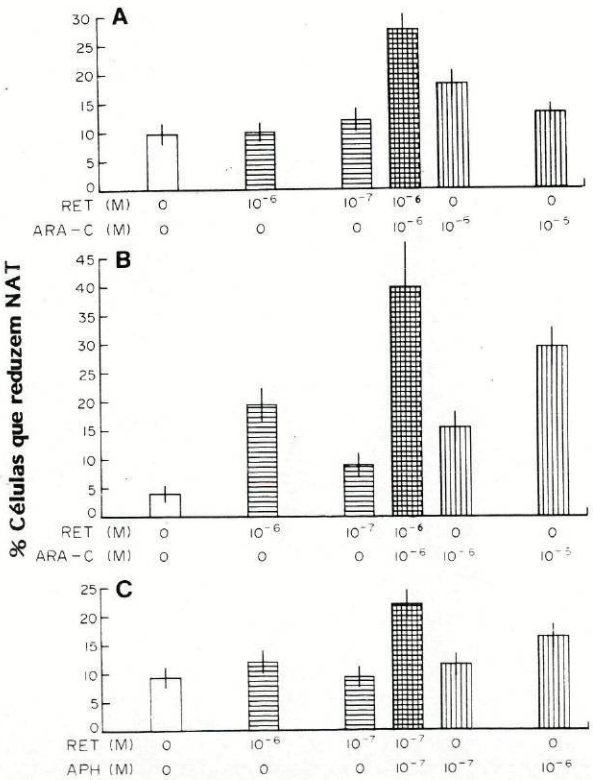


Fig. 17 - Resposta sinergística das combinações ARA-C/RET (A e B) e APH/RET (C), medida pela redução de NAT em culturas de suspensão de 4 dias. Foram utilizadas células de dadores normais (A e C) e de um doente com LAM consecutiva a SMD (B).

que combinações ARA-C + RET (2 casos) e APH + RET (1 caso) se mostram igualmente sinergísticas. O mesmo não acontece (fig. 18) com a combinação de 2 agentes inibidores da síntese de ADN (6-MP + APH), onde só se observa efeito aditivo.

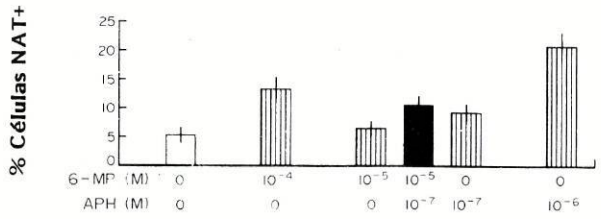


Fig. 18 - Indução de diferenciação em células normais pela combinação 6-MP/APH (redução de NAT, culturas de suspensão de 4 dias). A combinação de 2 agentes inibidores da síntese de ADN não era sinergística, mostrando um efeito meramente aditivo.

A redução do número de células clonogénicas em C.S. é concordante com os outros parâmetros de diferenciação, sendo igualmente reforçada pela associação sinergística de um inibidor da síntese de ADN (APH) e ácido retinoico, como se pode ver pelo exemplo exposto no Quadro IX e correspondente ao doente apresentado na fig. 17-C. A redução do número de células clonogénicas acompanha o aumento de positividade NAT e esterásica e revela-se inclusivamente uma medida mais sensível do efeito das drogas sobre a diferenciação celular do que estes parâmetros. Como exemplo, 10^{-6}M de RET era capaz de provocar redução significativa no número de células clonogénicas (Quadro IX) embora,

QUADRO IX. Redução no número de células clonogénicas na presença de afidicolina (APH) e ácido retinoico (RET) em culturas de suspensão (dia 4)

	Controle (diluente)	**RET (10^{-9}M)**	**RET (10^{-8}M)**	**RET (10^{-7}M)**	**RET (10^{-6}M)**
Controle (diluente)	100.0 ± 9.5%	110.1 ± 10.1%	103.7 ± 9.8%	66.1 ± 7.7%	61.4 ± 7.5%
APH (10^{-9}M)	80.7 ± 8.6%	62.4 ± 7.5%	45.9 ± 6.5%	32.1 ± 5.4%	NT
APH (10^{-8}M)	26.6 ± 4.9%	20.2 ± 4.3%	10.1 ± 3.0%	0.9 ± 0.9%	NT

No 4º dia das culturas de suspensão, alíquotas de células eram lavadas e recultivadas em agar. O número de células clonogénicas foi estimado a partir do número de clones (de 8 ou mais células) formados em culturas semi-sólidas secundárias. A contagem era feita ao 5º dia e as culturas controle continham 116.5 ± 11.1 células clonogénicas / 10^5 células nucleadas.
Os resultados são expressos em % do número de células clonogénicas no controle/controle ± erro padrão
NT = não testado

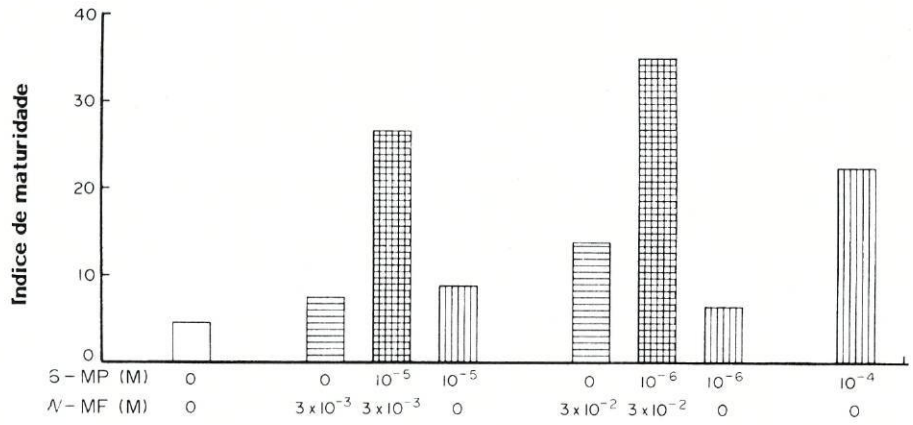


Fig. 19 - Índice de maturidade em culturas de 7 dias de células de um doente com SMD (LMMC). As colunas em branco representam células não tratadas, as colunas com riscas horizontais células tratadas só com N-MF, as colunas com riscas verticais células tratadas só com 6-MP e as colunas com riscas entrecruzadas células tratadas com diferentes combinações dos dois agentes.

com esta concentração, o aumento na percentagem de células com capacidade de reduzir NAT não fosse significativo (Fig. 17-C). Este efeito sobre o número de células clonogénicas processava-se a concentrações (dos agentes usados) incapazes de ter efeito inibitório sobre a proliferação das mesmas células em culturas primárias semi-sólidas e não é portanto aparentemente um efeito citotóxico.

Na fig. 19 pode também ver-se a evolução do índice de maturidade em culturas semi-sólidas (7 dias) expostas a diversas concentrações dos agentes indutores 6-MP e N-MF e combinações dos dois.

Inibidores da síntese de ADN interactuam sinergisticamente com outros agentes indutores na promoção da diferenciação celular

8 - ACÇÃO DA ISOFERRITINA ACÍDICA SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DE PROGENITORES GRANULOMONOCÍTICOS NORMAIS

Decidiu-se igualmente testar a influência que outros compostos e elementos fisiológicos (para além do CSF e da vitamina A) possam ter na diferenciação celular. De entre estes, dedicou-se especial atenção à isoferritina acídica (IFA). A ferritina é uma proteína de peso molecular de 450-550 Kd, com funções de armazenamento de ferro.[281] É constituída por 24 subunidades de dois tipos, H e L,[282,283] e pode armazenar até 4500 átomos

de Fe^{3+}.[281] As subunidades H têm um peso molecular (21 Kd) superior ao das L (19 Kd) e diferentes proporções das 2 subunidades condicionam diferentes pI da proteína. A isoferritina acídica é constituída por uma maior proporção de subunidades H e a básica de L.[282,283] Broxmeyer et al identificaram a IFA como a "leukemia inhibitory activity, LIA" e demonstraram que tinha um efeito inibidor sobre a proliferação de progenitores granulomonocíticos normais,[157] HLA-DR positivos e em fase S.[158] R. Taetle mostrou posteriormente que as células leucémicas não estavam sujeitas a este efeito inibitório.[160]

a) **Maturidade dos clones na presença ou ausência de IFA**

Começou-se por estudar o efeito da IFA sobre progenitores granulomonocíticos normais, em culturas semi-sólidas de agar. Para isso, depletou-se a medula de células de densidade >1.077 $g.cm^{-3}$ (e, nalguns casos, de células de d >1.063 $g.cm^{-3}$) e de células

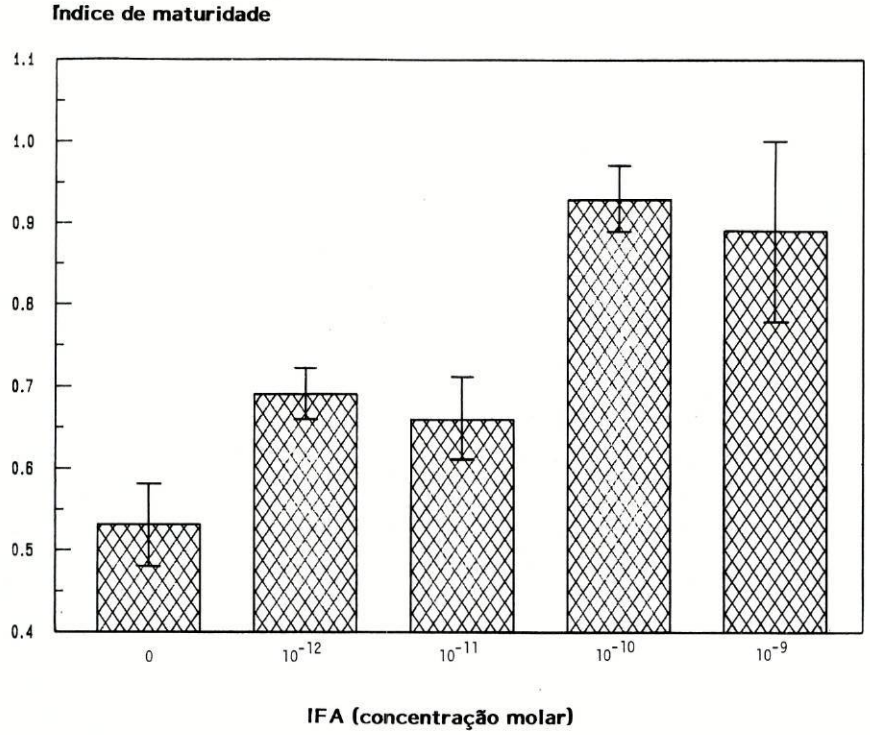


Fig. 20 - Efeito da isoferritina acídica (IFA) na maturidade dos clones: variação do índice de maturidade (I.M.2) com concentração de IFA. O IM 2 define-se como a razão do número de clones constituidos unicamente por células maduras pelo número de clones contendo células imaturas. O IM 2 aumentava com a concentração de ferritina e era significativamente superior ao controle a e acima de 10^{-10}M ($p < 0.05$ - "two sample t test"). Os resultados são expressos em média ± erro padrão de 4 experiências para os valores extremos (0 e 10^{-9}M IFA) e de 3 experiências para as concentrações intermédias.

aderentes para tentar evitar a contaminação por células reconhecidamente secretoras de ferritina e utilizou-se como estímulo um meio condicionado (5637CM) que se demonstrou não conter IFA.[161]

Verificou-se que as células clonogénicas assim estimuladas davam origem a clones que apresentavam maturidade mais acentuada nas culturas contendo IFA. Esta avaliação foi feita por observação microscópica dos clones *in situ*, após coloração pela técnica da dupla esterase (culturas de 7 dias). Um índice de maturidade (IM 2), diferente do anteriormente utilizado, foi usado para quantificar a diferenciação em cultura. Este IM 2 é definido pela divisão do número de clones contendo somente células maduras pelo número de clones que continham células imaturas, substituindo nestas experiências o anterior índice (IM 1). Isto era devido ao facto de, neste caso, a variação em relação ao normal se observar no sentido de maior maturidade, aconselhando deste modo a aumentar o denominador da fracção para tornar as variações do índice mais homogéneas. No entanto, os dois índices eram aproximadamente paralelos na sua variação.

A fig. 20 mostra que o IM 2 aumenta com a concentração de IFA e o aumento em relação ao controle é estatisticamente significativo ($p < 0.05$) a e acima de 10^{-10}M IFA.

b) **Remoção ("killing") de células em fase S (suicídio pela timidina tritiada)**

Para determinar se este efeito na maturidade das células clonais era simplesmente devido a remoção de progenitores em fase S, fez-se outro tipo de experiência. As células eram pré-incubadas com ^{3}H-TdR de alta actividade específica, lavadas e cultivadas em seguida. O tratamento com ^{3}H-TdR provocou uma diminuição acentuada do número de colónias (-44.4%) e de clones totais (-33.7%), mas não afectou a maturidade desses mesmos clones. O IM 2 das culturas semeadas com células previamente incubadas com ^{3}H-TdR não era significativamente diferente do obtido para as culturas de células não tratadas ($p > 0.5$) ou de células tratadas com timidina não marcada de igual molaridade ($p > 0.1$), como se pode ver na fig. 21.

c) **Diferenciação em culturas de suspensão**

Para além das culturas primárias, decidiu-se avaliar a diferenciação celular em C.S. estimuladas por 10-20% de 5637CM, um meio condicionado que não contem isoferritina acídica. As culturas estimuladas por este meio condicionado, na concentração de 20%, continham ao 5º dia mais 78.2% CFU-GM que as culturas sem estímulo exógeno e mais 58% CFU-GM que as culturas estimuladas por 5% de PHA-LCM. No 8º dia, o aumento em CFU-GM era de 169% e 134%, respectivamente. Havia relação linear entre

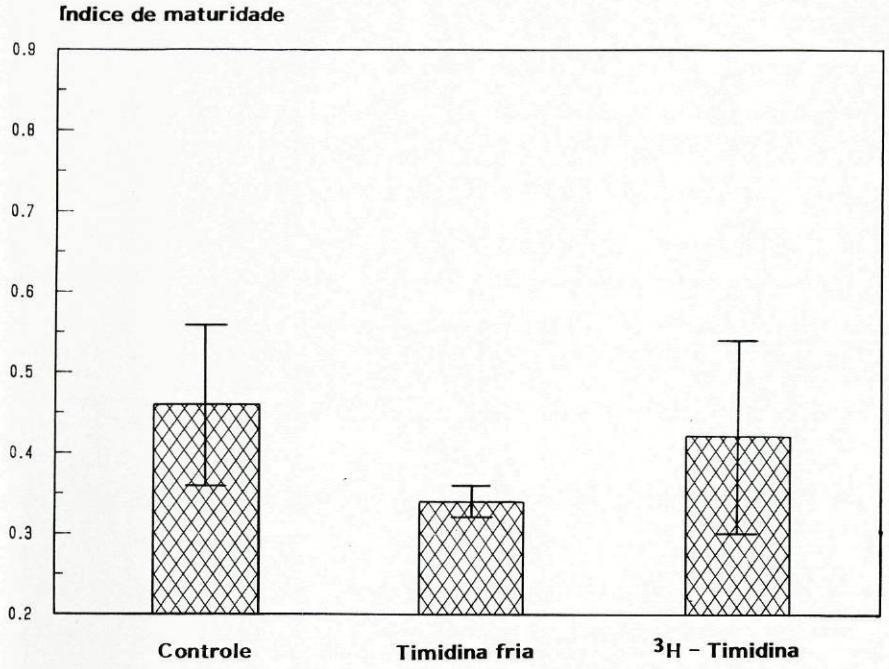


Fig. 21 - Efeito do suicídio pela timidina tritiada (^{3}H-TdR) na maturidade dos clones. As células tratadas com ^{3}H-timidina, timidina fria (na mesma concentração molar) ou meio de cultura não apresentavam índices de maturidade (IM 2) significativamente diferentes. Os resultados são expressos como média ± erro padrão de 2 experiências.

a concentração de 5637CM e o número de CFU-GM presentes em cultura, tanto ao 5º como ao 8º dia, e a estimulação máxima deu-se com a concentração de 20%. Também o número total de células nucleadas aumentava com a concentração de 5637CM.

QUADRO X. Número de células NAT positivas em culturas de suspensão contendo IFA

	Dias 2 a 4	**Dias 6 a 9**	**Dia 14**
Todas as preparações de IFA	140.4 ± 13.5% n = 5	124.7 ± 9.6% n = 5	112.8% n = 1
Baço - LMC	149.6 ± 18.0% n = 3	140.7 ± 19.0% n = 2	112.8% n = 1
Coração	126.7 ± 23.3% n = 2	114.1 ± 6.7% n = 3	

Calculou-se o número absoluto de células exibindo capacidade de reduzir o NAT, em diferentes pontos-tempo, tanto nas culturas que continham IFA como nas culturas controle. No quadro, o número de células NAT+ nas culturas contendo IFA é representado como % do controle (média ± erro padrão). O número de células positivas é significativamente superior nas culturas que contêm IFA entre os dias 2 e 4 ($p < 0.05$) e entre os dias 6 e 9 ($p < 0.05$). No conjunto dos tempos-ponto avaliados, a significância da diferença entre todas as preparações de IFA testadas e respectivos controles é de $p < 0.001$ ($t = 4.69$; $n = 11$) e entre as preparações de Baço-LMC e controles de $p < 0.02$ ($t = 3.89$; $n = 6$). O aumento em células NAT+ na incubação com a preparação de ferritina de coração não é significativo - $0.05 < p < 0.1$ ($t = 2.55$; $n = 5$).
Análise estatística - "t test for paired differences".

As células eram retiradas das C.S. para avaliação da diferenciação. Concluiu-se que o número absoluto de células capazes de reduzir NAT estava sempre aumentado nas culturas que continham IFA, em qualquer ponto-tempo escolhido (Quadro X), embora esse aumento só fosse significativo quando se utilizava a preparação de "CML-spleen". Em percentagem, também havia mais células NAT positivas nas culturas contendo IFA, mas o facto de elas serem superiores em número absoluto demonstra que o efeito da IFA não é causado por citotoxicidade (remoção de células imaturas, NAT negativas), mas é genuinamente indutor desta característica funcional.

Era evidente igualmente aumento da positividade esterásica nas culturas contendo ferritina acídica, como se pode ver pelo exemplo descrito na fig. 22.

d) Capacidade clonogénica em culturas de suspensão - outro índice de diferenciação

A capacidade clonogénica das células em C.S. é, como se viu (MAT & MET; RESULTADOS - ponto 6), uma medida bastante sensível de diferenciação celular. A redução do número de CFU-GM e de células clonogénicas em culturas contendo IFA, em vários pontos-tempo de 6 experiências (Quadro XI), reflecte deste modo uma maior diferenciação

QUADRO XI. Diminuição de CFU-GM e células clonogénicas totais nas culturas de suspensão contendo IFA

	CFU-GM			Células clonogénicas		
	Dias 3 a 5	Dias 6 e 7	Dias 10 a 14	Dias 3 a 5	Dias 6 e 7	Dias 10 a 14
Todas as preparações de IFA	67.0 ± 7.2% n = 6 p < 0.01	54.0 ±6.9% n = 5 p < 0.01	53.8 ± 46.2% n = 2 n.s. (p > 0.2)	73.0 ± 4.0% n = 6 p < 0.01	57.5 ± 8.1% n = 5 p < 0.05	82.0 ± 14.3% n = 3 n.s. (p > 0.1)
Baço - LMC	60.6 ± 5.5% n = 4 p < 0.01	43.6 ±4.2% n = 3 p < 0.01	7.5% n = 1	68.1 ± 3.3% n = 4 p < 0.01	44.8 ± 2.3% n = 3 p < 0.01	70.5 ± 15.0% n = 2 n.s. (p > 0.1)
Coração	79.8 ± 18.9% n = 2 n.s. (p > 0.2)	69.7 ± 1.2% n = 2 p < 0.05	100.0% n = 1	82.9 ±3.8% n = 2 n.s. (p > 0.1)	76.6 ± 5.9% n = 2 n.s. (p > 0.1)	104.9% n = 1

O número de CFU-GM e células clonogénicas por 10^5 células foi avaliado a partir da recultura de alíquotas das culturas de suspensão em agar em pontos-tempo precoces (dias 3 a 5), médios (dias 6 e 7) e tardios (dias 10 a 14). Os resultados obtidos nas culturas que continham IFA são expressos como % do controle (média ± erro padrão). O efeito menor foi observado com a preparação de ferritina de coração. Com esta só se obteve uma diferença estatisticamente significativa para o controle no número de CFU-GM nos dias 6-7. No entanto, se apreciarmos esse efeito no conjunto dos diversos pontos-tempo, encontra-se uma diferença estatisticamente significativa entre a IFA de coração e o controle, tanto no número de colónias ($p < 0.05$) como no de clones totais ($p < 0.05$), entre os dias 3 e 7. As culturas de suspensão contendo IFA de baço-LMC evidenciam, de forma consistente, menor número de CFU-GM e células clonogénicas que as culturas controle.
n = número de experiências
n.s. = não significativa
Análise estatística - "t test for paired differences" após transformação logarítmica do número de colónias e clones.

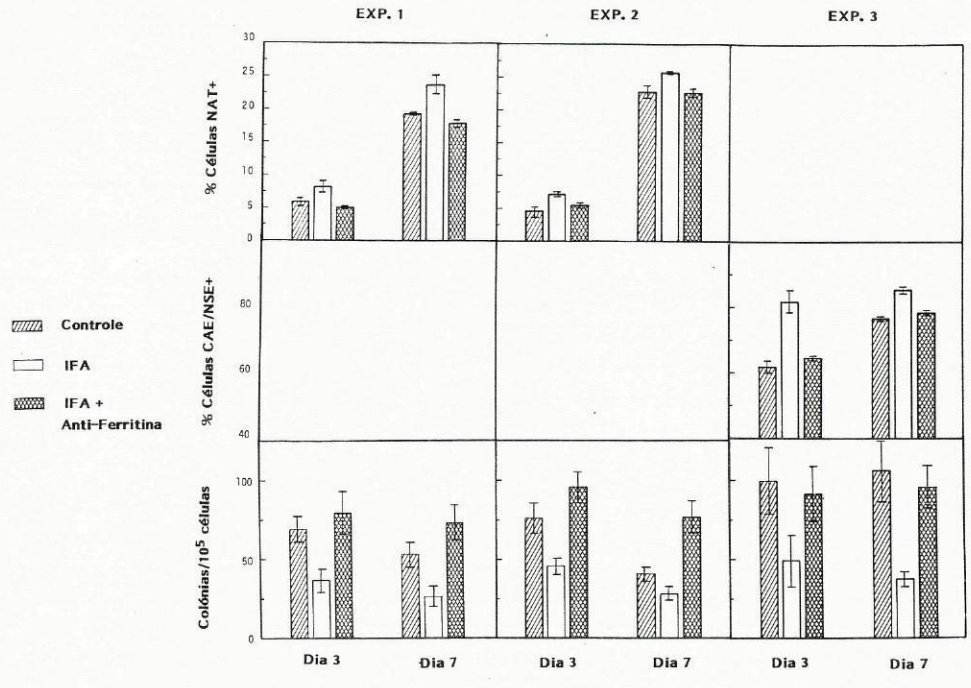


Fig. 22 - Reversão do efeito da IFA sobre a diferenciação celular, em culturas de suspensão de medula óssea normal, por um anticorpo anti-ferritina. Os parâmetros usados na avaliação da diferenciação foram a redução do NAT (em 2 experiências, painel superior), a positividade esterásica (1 experiência, painel do meio) e a capacidade de formar colónias (nas 3 experiências, painel inferior) das células em cultura de suspensão, em dois pontos-tempo diferentes (dias 3 e 7). Os valores (média ± erro padrão) para as células controle são representados nas colunas com riscas oblíquas, para as células tratadas com IFA nas colunas a branco e para as células tratadas com IFA + anticorpo anti-ferrritina nas colunas com riscas entrecruzadas.

das células cultivadas na presença de IFA. Novamente, o efeito maior foi obtido com a preparação de "CML-spleen".

Havia ainda restricção do potencial de linhagem nas culturas que continham IFA. Assim a percentagem de clones de dupla linhagem, granulocítica-monocítica, encontrava-se diminuída nas culturas contendo IFA (-26.6 ±5.4% que o controle) com aumento do número de clones formados só por monócitos-macrófagos (+47.0 ± 3.7% que no controle), o que indica diminuição de precursores bipotenciais, mais imaturos.

e) **Culturas secundárias**

Nas culturas primárias apareciam frequentemente agregados de células redondas, grandes, não incorporadas no gel (situavam-se ou em cima ou por baixo do gel) e não identificáveis como clones de granulócitos e/ou macrófagos. Estas células, coradas pelo Wright, tinham morfologia de células imaturas com núcleo grande e aparentemente jovem e citoplasma hiperbasófilo.

Quando recuperadas do disco e recultivadas, estas células tinham a capacidade de dar origem a novos clones e colónias, embora em menor número que nas culturas primárias. Em 2 experiências efectuadas o número de colónias originadas a partir da cultura primária variou entre 3.1 e 7.5 e o número total de clones entre 83.8 e 111.9. Nas culturas estabelecidas a partir de células que tinham estado expostas a IFA nas culturas primárias, estes números eram muito mais baixos (0 a 0.63 colónias; 58.8 a 75.0 clones).

f) **Neutralização da IFA com um anticorpo anti-ferritina acídica**

Quando se tratava previamente a IFA com um anticorpo, produzido em coelhos, contra a ferritina de coração (acídica), o efeito sobre a diferenciação GM deixava de se notar. Na fig. 22, pode ver-se que o tratamento com anti-ferritina revertia o aumento de células capazes de reduzir o NAT ou exibindo positividade esterásica e a diminuição do número de CFU-GM. Em 5 de 8 subculturas, havia mesmo um aumento de CFU-GM em relação ao controle, embora não estatisticamente significativo, o qual se pode dever a neutralização de ferritina residual presente no meio. Culturas controle contendo só anticorpo anti-ferritina (não mostradas na figura) também continham maior número de CFU-GM que o controle simples, em 6 de 8 casos.

A variação do número de CFU-GM mantém uma correlação inversa bastante regular com a variação do número de células capazes de reduzir NAT ou com positividade esterásica.

A isoferritina acídica aumenta (ou acelera) a diferenciação de progenitores granulomonocíticos normais em cultura e este efeito é revertido por um anticorpo anti-ferritina acídica

9 - EFEITO DA ISOFERRITINA BÁSICA

Procurou-se igualmente ver se a isoferritina básica (IFB) tinha algum efeito na diferenciação GM normal. Não se observou qualquer efeito significativo da IFB no número de CFU-GM (77.7 ± 18.5% do controle, ao 7º dia das C.S.; $p > 0.5$) ou na percentagem de células com positividade esterásica (96.1 ± 6.5% do controle, também ao dia 7; $p > 0.5$).

A isoferritina básica não tem qualquer efeito aparente na diferenciação granulomonocítica normal

10 - EFEITO DA DESFERRIOXAMINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO E A DIFERENCIAÇÃO MIELOIDES NORMAIS

Várias proteínas do metabolismo do ferro (ferritina, IFA, lactoferrina, LF, transferrina, TF) têm efeitos inibitórios sobre a proliferação mieloide normal, quer por inibição directa das CFC-GM (IFA),[157] quer por inibição da produção do estimulante normal da granulopoiese, GM-CSF (LF,TF).[146,284]

Devido a esta curiosa coincidência e ao facto de existir evidência de o ferro e a transferrina estarem associados à proliferação celular,[122,165,285-289] decidiu-se testar o efeito da privação de Fe nos progenitores GM normais. Para esse objectivo, usou-se o quelante Desferrioxamina (DFX), uma hidroxilamina que se liga a quantidades equimolares de ferro. Medula óssea normal foi cultivada na presença (ou ausência) de DFX, tanto em culturas semi-sólidas primárias como em culturas de suspensão.

a) **Culturas primárias**

A DFX, na concentração de 10^{-5}M, abolia completamente a formação de colónias GM em culturas de agar de 7 dias e reduzia o número total de clones a 18.4 ±4.5% do controle. Uma concentração de 10^{-4}M reduzia ainda mais o número de clones (2.1 ±0.4% do controle), mas este efeito era revertido pela adição ao meio de uma concentração equimolar de $FeCl_3$ (Fig. 23).

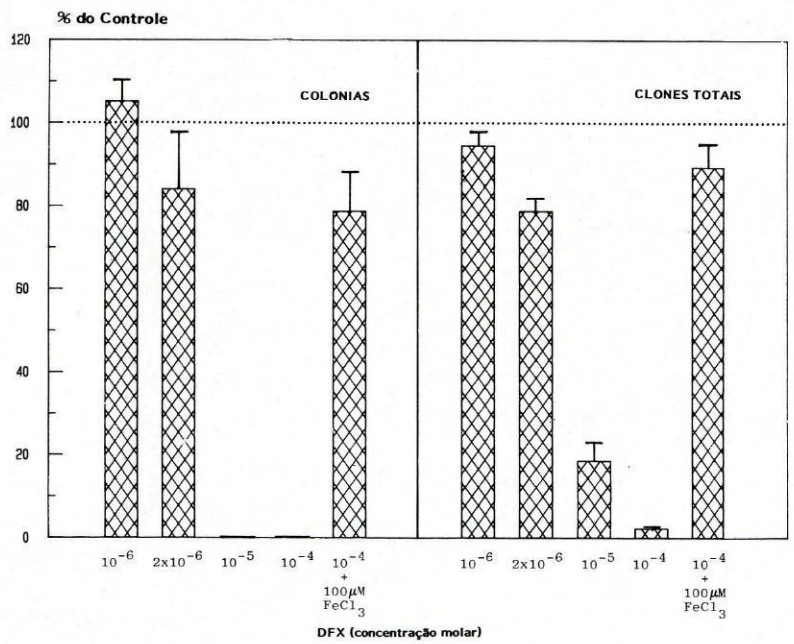


Fig. 23 - Efeito de diferentes concentrações de desferrioxamina (DFX) ±$FeCl_3$ no número de colónias e no número total de clones formados em culturas semi-sólidas de agar (7 dias) de medula óssea normal. Os resultados são expressos em % do controle (média ± erro padrão).

No entanto, se as células medulares fossem pré-incubadas durante 2 horas com essa mesma concentração de 10^{-4}M DFX, lavadas e posteriormente cultivadas na ausência de DFX, não se observava qualquer efeito inibitório. Este facto e a reversão do efeito da DFX pela adição de $FeCl_3$ sugerem que a Desferrioxamina não actua por efeito citotóxico directo, mas por efeito inibidor da proliferação celular relacionado com a subtração de ferro às células.

b) **Culturas de suspensão**

Se as mesmas células cuja proliferação era inibida em culturas de agar fossem cultivadas em suspensão, durante os mesmos 7 dias, na presença de iguais concentrações de DFX, verificava-se algo de paradoxal. A concentração de 10^{-5}M, que inibia quase completamente a proliferação nas culturas primárias, pouco afectava o número de CFU-GM em culturas de suspensão (Fig. 24). Quando as células eram retiradas da C.S. contendo 10^{-5}M DFX ao fim de 7 dias, lavadas e recultivadas em agar na ausência de DFX,

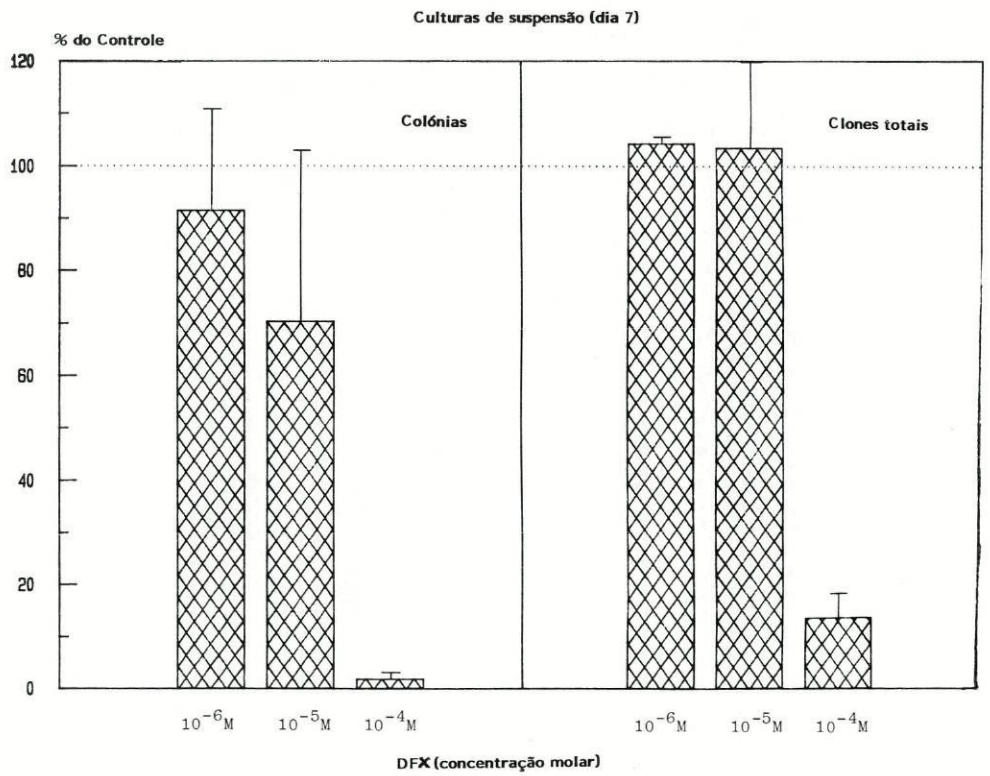


Fig. 24 - Efeito de diferentes concentrações de DFX no número de CFU-GM e células clonogénicas totais presentes em culturas de suspensão de medula normal, ao dia 7. Os resultados são expressos em % do controle (média ± erro padrão).

observava-se apenas modesta redução na formação de colónias GM quando comparada com o controle (70.6 ±32.2% do controle CFU-GM/10^5 células ou 57.7 ±21.9% do controle CFU-GM/ml da C.S.) A redução do número de CFU-GM era mais acentuada nas culturas estimuladas por PHA-LCM do que nas culturas estimuladas por 5637CM, o que se pode dever ao facto de este meio condicionado ter menor actividade diferenciante que o primeiro.

Em C.S., mesmo uma concentração dez vezes mais alta de DFX permitia a presença de alguns progenitores GM, ao fim de 7 dias de incubação (colónias - 1.7± 1.4% e clones totais - 13.7 ±4.8% do controle).

Este efeito é semelhante ao obtido por pré-incubação das células com DFX e descrito na alínea anterior, mas com duas diferenças essenciais: a incubação era muito mais prolongada (7 dias em vez de 2 horas) e as C.S. continham CSF exógeno que estimula as células a proliferar.

c) **Efeito na diferenciação**

Paralelamente, estudou-se a acção da DFX sobre a diferenciação granulomonocítica normal. O número absoluto de células capazes de reduzir o NAT, ao fim de 7 dias de cultura em suspensão, aumentava quando estas células eram cultivadas na presença de 10^{-5}M (162.5% do controle) ou $5x10^{-6}$M (162.4% do controle) (Quadro XII). Estas

QUADRO XII. Percentagem de células NAT positivas em culturas de suspensão de medula óssea normal (3 experiências)

	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Número absoluto de cél. NAT+ (% do controle)
Controle	3.5 ± 1.3%	39.9 ± 3.4%	47.0 ± 3.5%	-
10^{-6}M DFX	3.0 ± 1.2%	-	61.0 ± 3.4%	115.2%
5 x 10^{-6}M DFX	16.0 ± 2.6%	-	61.0 ± 3.4%	162.4%
10^{-5}M DFX	21.5 ± 2.9%	53.0 ± 3.5%	57.5 ± 3.5%	162.5%
10^{-4}M DFX	49.0 ± 5.0%	30.0 ± 3.2%	51.0 ± 5.0%	163.3%
10^{-5}M HU	5.5 ± 1.6%	49.5 ± 3.5%	-	229.6%
10^{-4}M HU	11.0 ± 2.2%	-	-	-

As células eram retiradas das culturas de suspensão ao 7º dia e expostas a sobrenadante de "caldo" de E. coli e nitroazultetrazólio (NAT). Contava-se a percentagem de células que exibiam depósitos azuis escuros de formazan, indicativos de redução de NAT. Notou-se um aumento significativo da percentagem de células NAT+ ($p < 0.05$), em relação ao controle, nas culturas contendo DFX nas concentrações de 5 x 10^{-6}M e 10^{-5}M.
Na coluna da direita, dá-se a representação do número absoluto de células NAT+ presentes nas culturas de suspensão, expresso em % do controle. Este valor indica que o efeito da DFX e HU é genuinamente indutor daquela característica de maturidade e não resulta de uma eliminação selectiva de células NAT-.
Alguma diferença observada, de experiência para experiência, na percentagem de células NAT+ deve ser atribuida a diferente pureza da população inicial, a diferenças nas condições de cultura ou do estímulo fornecido (PHA-LCM na experiência II e 5637CM nas outras duas).

diferenças são estatísticamente significativas ($p < 0.05$). Na concentração de 10^{-4}M, o efeito não era consistente (em 1 de 3 experiências havia menos células NAT positivas que no controle), o que provavelmente se deve ao efeito citotóxico da DFX nesta concentração.

Também a positividade esterásica aumentava com a DFX, quer em percentagem quer em número absoluto de células exprimindo CAE ou NSE (Quadro XIII), mas este

QUADRO XIII. Percentagem de células CAE/NSE positivas em culturas de suspensão (dia 7) de medula óssea normal

	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Número absoluto de cél. CAE/NSE+ (% do controle)
Controle	38.1 ± 2.2%	79.6 ± 1.8%	56.0 ± 3.5%	-
10^{-6}M DFX	46.8 ± 3.2%	-	63.0 ± 3.4%	109.0% (n.s.)
5 x 10^{-6}M DFX	38.4 ± 3.1%	-	61.0 ± 3.4%	93.4% (n.s.)
10^{-5}M DFX	54.4 ± 3.2%	85.6 ± 2.2%	64.5 ± 3.4%	119.7% ($p < 0.05$)
10^{-4}M DFX	65.2 ± 3.0%	80.0 ± 4.0%	73.5 ± 3.1%	100.8% (n.s.)

As células das culturas de suspensão eram também coradas pela dupla esterase (CAE/NSE). Este quadro representa resultados de 3 experiências e, na coluna da direita, o número absoluto de células expressando positividade esterásica (em % do controle), pelas razões já descritas no Quadro XII (por exemplo, a concentração de 10^{-4}M DFX, embora aumente a percentagem de células CAE/NSE+ não produz aumento do seu número absoluto, em relação às culturas controle).

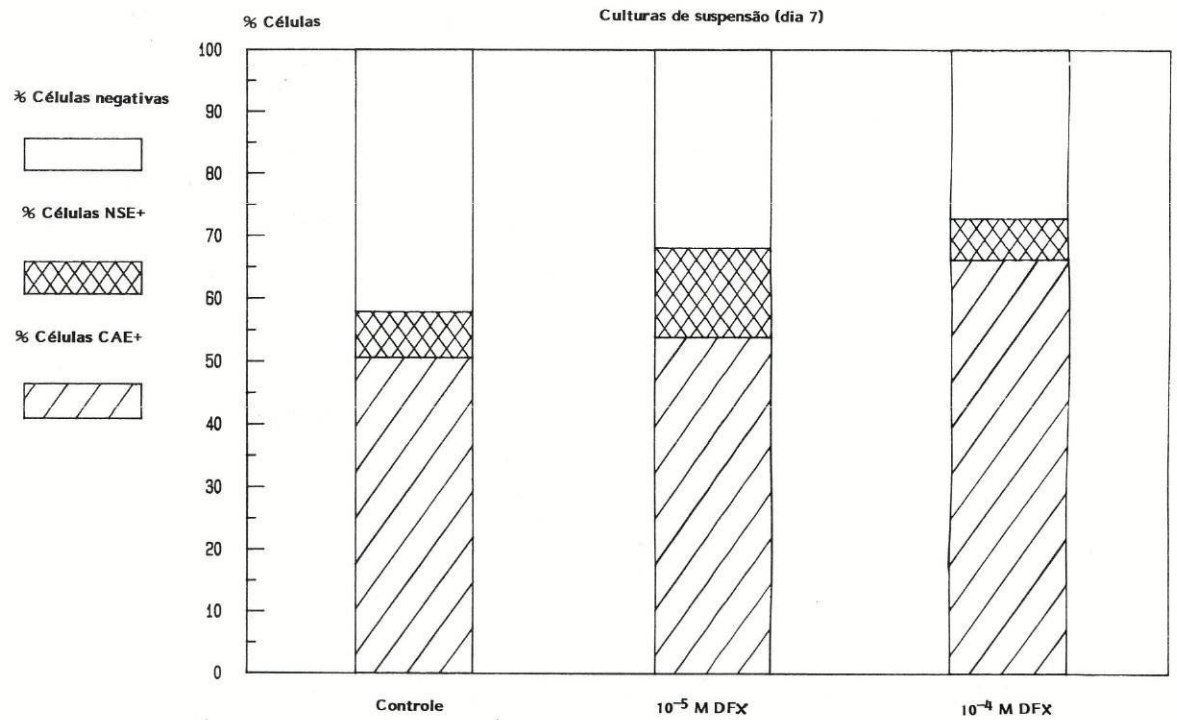


Fig. 25 - Percentagens relativas de células CAE+ (fracção das colunas com riscas oblíquas), NSE+ (fracção das colunas com riscas entrecruzadas) e negativas (fracção a branco das colunas) em culturas de suspensão de medula óssea normal. As colunas representam células de culturas que tinham sido expostas a diversas concentrações de DFX (0, 10^{-5}M, 10^{-4}M). Alíquotas de células foram retiradas das culturas de suspensão e coradas pela dupla esterase. Pelo menos 200 células foram contadas por cada condição.

aumento só era significativo ($p < 0.05$) a 10^{-5}M. Com esta concentração, o aumento de positividade esterásica (em relação ao controle) era principalmente devido ao aumento de esterase inespecífica (NSE), sugerindo que a diferenciação monocítica era preferencialmente estimulada (Fig. 25).

A Desferrioxamina inibe a proliferação e estimula a diferenciação mieloide normal. Este efeito é aparentemente devido à sua propriedade de quelar ferro

11 - EFEITO DA DESFERRIOXAMINA E DE UM ANTICORPO ANTI-RECEPTOR DA TRANSFERRINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO E A DIFERENCIAÇÃO DE LINHAS CELULARES LEUCÊMICAS

Em seguida, estudaram-se os efeitos da Desferrioxamina e de dois anticorpos anti-receptor da transferrina (Atc anti-Rec TF), 42/6 e B3/25, na proliferação e diferenciação das linhas celulares leucémicas HL60, ML2 e K562.

A DFX parece quelar ferro intracelular, de um "pool" lábil (ou em trânsito) de baixo peso molecular.[257] Pode igualmente reagir com Fe presente no meio de cultura, embora não possa deslocar Fe ligado à transferrina.[256,258,290]

A principal rota de entrada de Fe na célula é constituida pela endocitose da TF mediada pelo seu receptor.[263,264] Interferindo com este mecanismo, pode-se impedir a incorporação e reduzir o nível intracelular de ferro.

O anticorpo B3/25 é uma IgG que reconhece o receptor da transferrina (Rec TF), mas não bloqueia o sítio de ligação da TF;[267] o atc 42/6 é uma IgA e compete com a TF para a ligação ao receptor, tendo mais afinidade para este que a própria TF.[269]

As 3 linhas celulares estudadas tinham diferente expressão de Rec TF (Quadro XIV). Eram no entanto semelhantes as percentagens de positividade obtidas com o atc

QUADRO XIV. Percentagem de células positivas para os anticorpos 42/6 e B3/25 (dia 0)

	HL60	ML2	K562
42/6	86.0 + 3.0%	28.5 + 3.2%	56.0 + 3.5%
B3/25	80.4 + 0.9%	39.5 + 3.5%	47.0 + 3.5%

As células das diferentes linhas celulares foram incubadas com os anticorpos 42/6 ou B3/25 e, em seguida, com-GαM-FITC, no início das culturas (dia 0). A intensidade de fluorescência variava de + (ML2) a +++ (HL60). K562 ++.

42/6 e com o atc B3/25. HL60 era a linha celular com maior percentagem de células positivas para os dois anticorpos; as células positivas exibiam também maior intensidade de fluorescência, o que sugere densidade antigénica mais elevada. Cerca de 50% das células de K562 eram positivas, com uma boa intensidade de fluorescência. Em ML2, só aproximadamente um terço das células evidenciavam positividade e a fluorescência era fraca.

a) **Efeito na proliferação**

O atc bloqueante do Rec TF (42/6) tinha efeito pronunciado no crescimento de HL60 (Fig. 26). Vinte µg/ml de 42/6 reduziam o número de células viáveis, ao dia 7, a 11.7% do controle e mesmo uma concentração muito baixa de atc (0.5 µg/ml) diminuia esse valor para 29.1% do controle. O efeito em ML2 era menos pronunciado e aparecia a concentrações mais elevadas (20 µg/ml - 46.8%, 5 µg/ml - 62.5% do controle). Em K562, o efeito era ligeiro e só aparecia na concentração máxima utilizada do atc (20µg/ml - 76.7% do controle).

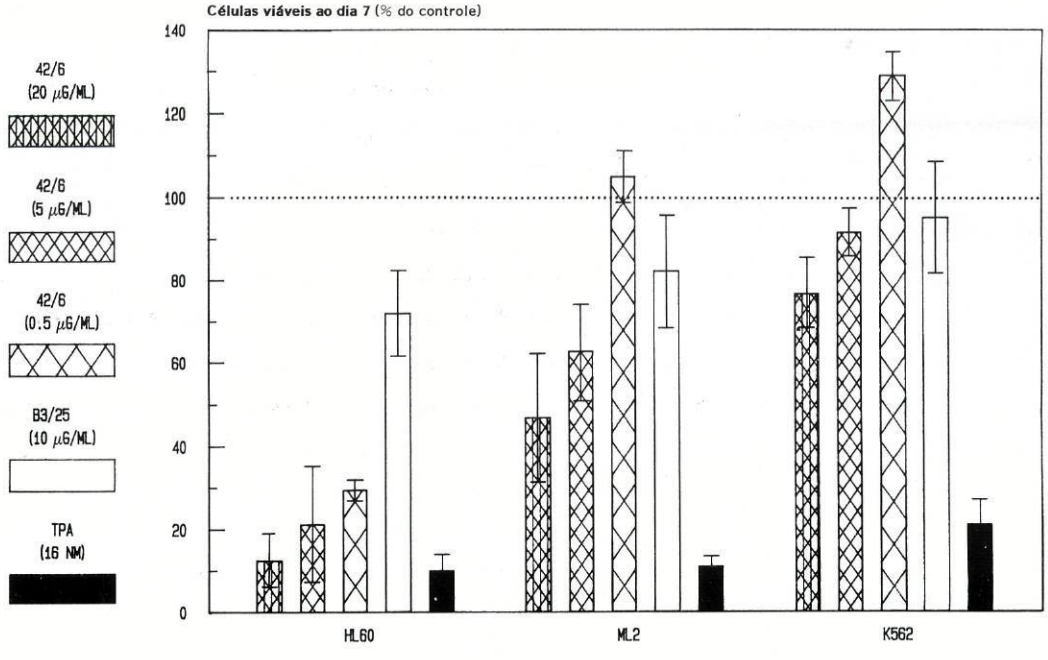


Fig. 26 - Número de células viáveis das linhas celulares leucémicas HL60, ML2 e K562, no dia 7 de culturas líquidas na presença de 20, 5 ou 0.5 µg/ml do anticorpo 42/6, de 10 µg/ml do anticorpo B3/25 ou de 16 nM de TPA. Alíquotas de células eram retiradas das culturas, contadas num contador Coulter e a viabilidade avaliada pelo teste de exclusão pelo Azul Tripano. Os resultados são expressos em % do controle (células cultivadas só na presença de meio de cultura ou dos diluentes específicos) - média ± erro padrão de 5 experiências. A correspondência dos símbolos é dada no quadro anexo.

QUADRO XV. Efeito de DFX e HU no crescimento de linhas celulares leucémicas

	HL60	ML2	K562
10^{-6}M DFX	99.9 ± 2.6% n = 2	99.3 ± 5.2% n = 2	-
10^{-5}M DFX	13.3 ± 1.8% n = 5	16.3 ± 2.6% n = 4	77.2 ± 6.7% n = 3
10^{-4}M DFX	7.7 ± 4.5% n = 2	9.8 ± 2.7% n = 2	-
10^{-4}M DFX + 100 µM $FeCl_3$	90.2 ± 5.6% n = 2	93.7 ± 5.1% n = 2	-
10^{-4}M HU	29.1 ± 6.3% n = 2	12.2 ± 5.1% n = 2	73.8 ± 6.6% n = 2

Contagens ao 7º dia, em duplicado para cada experiência. O número de células em cada condição é expresso em % do controle (média ± erro padrão).
n = número de experiências.

O atc não-bloqueante (B3/25), que serviu como controle específico da acção do atc 42/6, só tinha efeito marginal na proliferação de HL60 (71.9% do controle).

A DFX era também fortemente inibitória das linhas celulares HL60 e ML2 (Quadro XV): 10^{-5}M reduzia a proliferação de HL60 para 13.3% e de ML2 para 16.3% do controle (número de células viáveis - 5.1% e 7.9% do controle, respectivamente), mas só afectava marginalmente o crescimento de K562 (77.2% do controle). A adição de 100 µM $FeCl_3$ ao meio de cultura revertia o efeito de uma concentração de DFX tão alta como 10^{-4}M.

A Hidroxiureia, HU (10^{-4}M) tinha efeito grosseiramente equivalente ao de 10^{-5}M DFX na proliferação das 3 linhas celulares estudadas. Por outro lado, o forbol éster TPA (16 nM) era consistentemente, e fortemente, inibidor das linhas HL60, ML2 e K562 (Fig. 26).

b) **Efeito na diferenciação**

As células de HL60 e ML2 tratadas com o Atc Mc 42/6 tendiam a perder a sua morfologia habitual e a apresentar-se com núcleo redondo, mais condensado, e citoplasma abundante com vacuolização. Embora não se notasse significativa aderência ao plástico, algumas células assumiam o aspecto de macrófagos. Ao 5º dia de cultura, 48.3% das células de HL60 expostas a 20µg/ml do atc 42/6 exibiam depósitos de formazan demonstrativos da sua capacidade de reduzir o NAT (e portanto de produção de superóxido, o que é uma característica de célula madura); concentrações mais baixas de atc (5 µg/ml) produziam 43.3% de células NAT positivas, enquanto que só 12.3% das células não tratadas

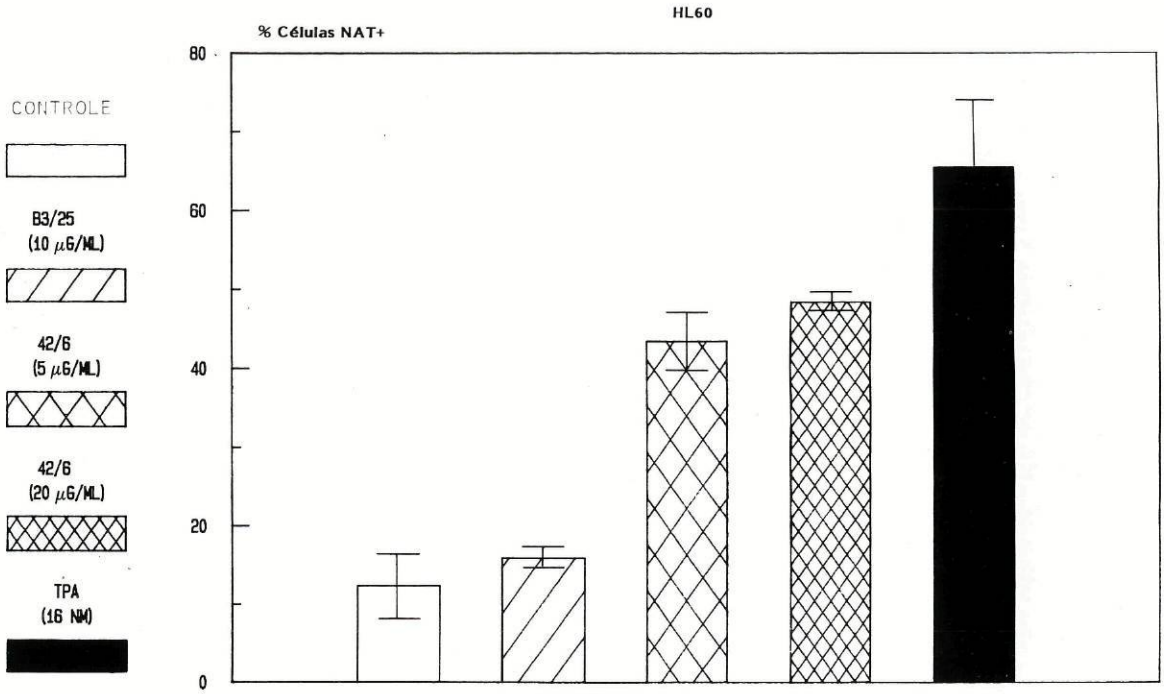


Fig. 27 - Percentagem de células NAT+ em culturas de suspensão da linha promielocítica HL60, ao fim de 5 dias de cultura na presença do anticorpo 42/6 (5 ou 20 µg/ml), do anticorpo B3/25 (10 µg/ml), de TPA (16 nM) ou de meio de cultura (controle). As células retiradas das culturas eram estimuladas a reduzir o nitroazultetrazólio pelo sobrenadante de um "caldo" de E. coli.

e 16% das células tratadas com o Atc controle (B3/25) tinham esta capacidade (Fig. 27). A percentagem de células com capacidade de redução do NAT produzidas pelo tratamento com 42/6 era inferior à obtida pelo tratamento com TPA (65.5%), um conhecido

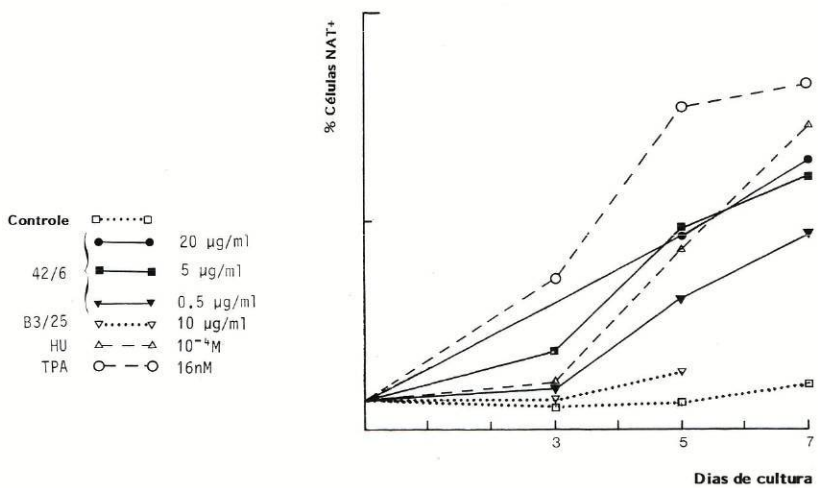


Fig. 28 - Evolução da capacidade de reduzir NAT da linha leucémica HL60, num exemplo representativo. A figura representa a percentagem de células NAT+ nos dias 0, 3, 5 e 7 de culturas de suspensão que continham 20, 5 ou 0.5 µg/ml de anticorpo 42/6, 10 µg/ml de B3/25, 16 nM de TPA, 10^{-4}M de HU ou meio de cultura (controle). A correspondência dos símbolos é dada no quadro anexo.

indutor da diferenciação monocítica nestas linhas celulares. O TPA (12-0-tetradecanoil-forbol-13-acetato) também induzia aderência ao plástico. A percentagem de células positivas no tratamento com 42/6 aumentava progressivamente com o tempo de cultura, entrando em *plateau* pelo dia 7, altura no entanto em que era já patente um forte efeito citotóxico, principalmente em HL60 (ver Quadro XV). A HU (10^{-4}M) tinha efeito paralelo ao Atc 42/6 nestas duas linhas celulares, como se pode ver na Fig. 28.

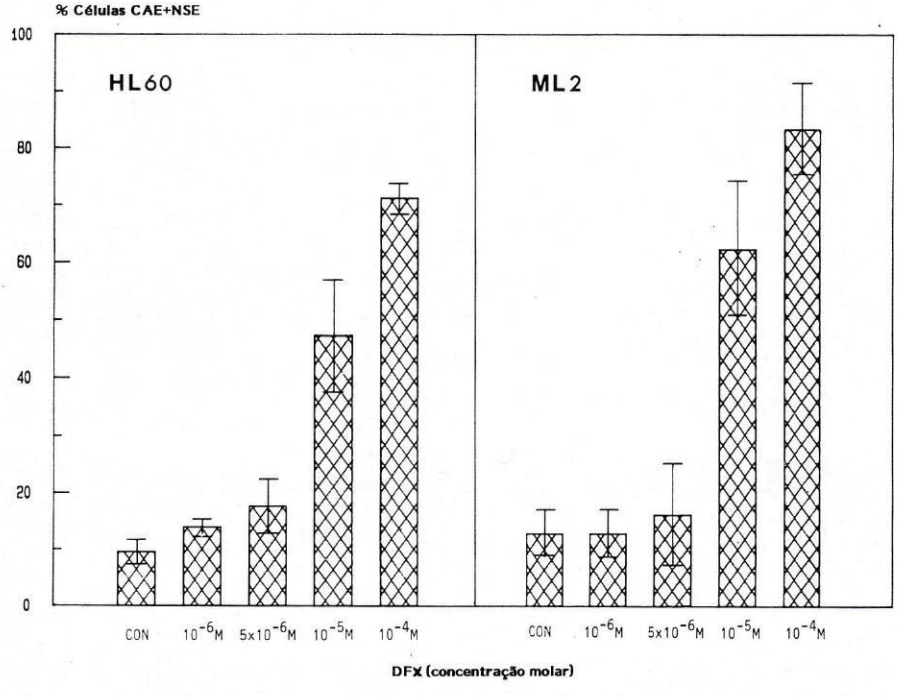


Fig. 29 - Percentagem de células CAE/NSE positivas em culturas das linhas celulares HL60 e ML2 expostas durante 3-4 dias a diferentes concentrações molares de DFX ou a meio de cultura (CON). Como estas linhas celulares expressam normalmente positividade esterásica cloroacetato (CAE), só células fortemente CAE positivas foram contadas como tal. A positividade não específica (NSE) variava de ligeira (+) a moderada (++) e era o contributo maior para o aumento da positividade esterásica em culturas tratadas com DFX. Os gráficos representam a média ± erro padrão de 3 experiências. Em números absolutos (percentagem de células positivas vezes número de células em cultura), há mais 110.1% de células positivas em HL60 e mais 311.6% em ML2 nas culturas com 10^{-5}M DFX do que no controle, logo o aumento de percentagem de células esterase positivas não pode ser atribuído a uma acção meramente citotóxica.

A DFX (10^{-5}M) induzia aparência morfológica semelhante ao Atc 42/6, pelo 3º-4º dia de cultura. A partir do 5º dia, porém, esta concentração de DFX era muito deletéria para as células e o seu efeito predominantemente citotóxico. Não se observava, tal como com o 42/6, aderência ao plástico. Havia no entanto aumento da percentagem de células esterase positivas, fundamentalmente esterase inespecífica (NSE) (Fig. 29). Esta observação era aparente quer em HL60 quer em ML2, mas a positividade NSE era menos intensa que em macrófagos normais ou mesmo em células tratadas com TPA.

Quando se cultivava HL60, durante 2 dias, na presença do Atc 42/6 ou de DFX

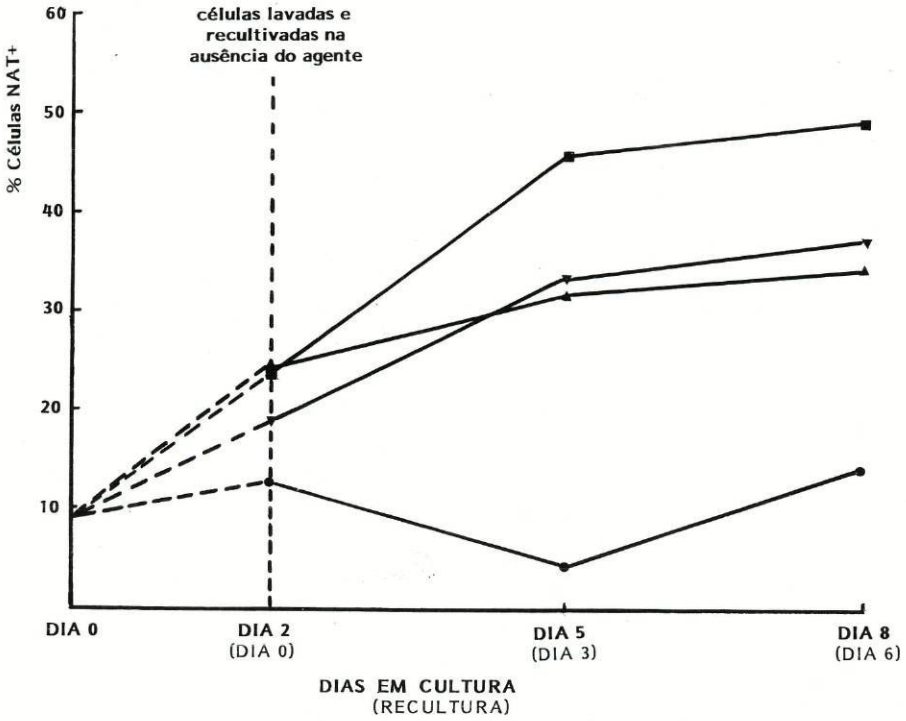


Fig. 30 - Evolução da capacidade de reduzir NAT em células da linha HL60 incubadas durante 2 dias com 20 (▲) ou 5 µg/ml (▼) de anticorpo 42/6 ou com 10^{-5}M de DFX (■) em comparação com o controle (●). Após 2 dias em cultura, as células eram lavadas e recultivadas em meio de cultura fresco. A avaliação da positividade NAT era feita como anteriormente descrito.

e, após esse tempo de incubação, se lavavam as células e se recultivavam em meio de cultura fresco (não contendo aqueles agentes), as células tratadas proliferavam em menor ritmo e continuavam a evidenciar sinais de diferenciação (Fig. 30). Daqui se pode inferir que essas células dão provavelmente um passo (ou mais) no sentido da diferenciação terminal, perdendo concomitantemente potencial proliferativo. O facto de continuarem a proliferar, embora mais lentamente (1), sugere que isto se deve à restauração do mecanismo normal de entrada de ferro na célula e à provisão adequada deste para o metabolismo nuclear.

Nenhum dos agentes estudados induzia diferenciação mielomonocítica de K562 e estas células conservavam a sua morfologia habitual. No entanto, não foram usados marcadores específicos de diferenciação eritroide.

Um anticorpo que bloqueia o receptor da transferrina, a desferrioxamina e a hidroxiureia inibem a proliferação das linhas celulares HL60 e ML2 e induzem nas suas células características morfológicas e funcionais de diferenciação

---

(1) O facto de a proliferação ser mais lenta tem provavelmente que ver com a proporção de células ainda com capacidade proliferativa.

12 - EFEITO DA DESFERRIOXAMINA E DO ANTICORPO ANTI-RECEPTOR DA TRANSFERRINA NA SÍNTESE DE ADN.

Para determinar se os efeitos da DFX e do Atc anti-Rec TF eram imediatamente citotóxicos para as células leucémicas, ou em que medida afectavam a síntese de ADN, resolveu-se estudar a incorporação de timidina tritiada (^{3}H-TdR) na linha celular HL60.

Paradoxalmente, o forte efeito inibitório do Atc 42/6 sobre o crescimento celular não se traduzia em diminuição da incorporação de ^{3}H-TdR, no curto prazo (4h e 24h) (Quadro XVI). Pelo contrário, notava-se aumento significativo da incorporação pelas células de HL60, tanto às 4h como às 24h, com qualquer das concentrações testadas do Atc 42/6 (excepto na de 0.5 g/ml, às 24h).

A DFX (10^{-5}M) e a HU (10^{-4}M) causavam também aumento de incorporação de ^{3}H-TdR, mas estes aumentos só eram significativos às 4h para a DFX e às 24h para a HU.

QUADRO XVI. Incorporação de ^{3}H-TdR em células de HL60

Agente	Concentração	4 h	24 h
42/6	20 µg/ml	128.6 ±7.9% 5 exp; n = 12 p< 0.01	135.1± 7.9% 4 exp; n = 10 p< 0.05
42/6	5 µg/ml	129.1± 9.3% 4 exp; n = 9 p< 0.05	128.1± 7.2% 4 exp; n = 10 p <0.01
42/6	0.5 µg/ml	134.0 ±11.9% 4 exp; n = 10 p <0.001	115.6 ±8.6% 3 exp; n = 6 n.s. (p > 0.1)
B3/25	10 µg/ml	111.4 ±10.9% 2 exp; n = 6 n.s. (p > 0.1)	107.8 ±5.5% 2 exp; n = 4 n.s. (p > 0.1)
DFX	10^{-5}M	141.1± 4.1% 2 exp; n = 6 p <0.001	117.4 ±23.0% 2 exp; n = 7 n.s.
HU	10^{-4}M	116.2 ±12.6% 2 exp; n = 6 n.s. (p > 0.1)	174.3 ±21.9% 3 exp; n = 8 p <0.001
$FeCl_3$	10^{-4}M	163.3 ±15.6% 2 exp; n = 6 p <0.01	107.3% 1 exp; n = 3 n.s. (p > 0.5)

As células de HL60 eram incubadas com ^{3}H-TdR após 4h ou 24h na presença dos agentes mencionados. Os resultados são expressos em % do controle (incubação em diluente - meio de cultura).
exp = número de experiências
n = número de observações
n.s. = não significativa
Análise estatística - "t test for paired differences".

A incorporação de ^{3}H-TdR nas células tratadas com o Atc B3/25 não era significativamente diferente do controle.

De realçar que a adição de 100 µM $FeCl_3$ ao meio de cultura causava também aumento precoce (às 4h) da incorporação de timidina tritiada (163.3% do controle), mas esse efeito tornava-se desprezível às 24h.

Concentrações inibitórias da proliferação de células leucémicas de anticorpo anti-receptor da transferrina, de desferrioxamina e de hidroxiureia não diminuem a incorporação precoce de timidina tritiada, antes a estimulam

13 - ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOFLUOROMETRIA DE FLUXO

As células de HL60 tratadas com Atc 42/6, DFX e HU foram estudadas no FACS

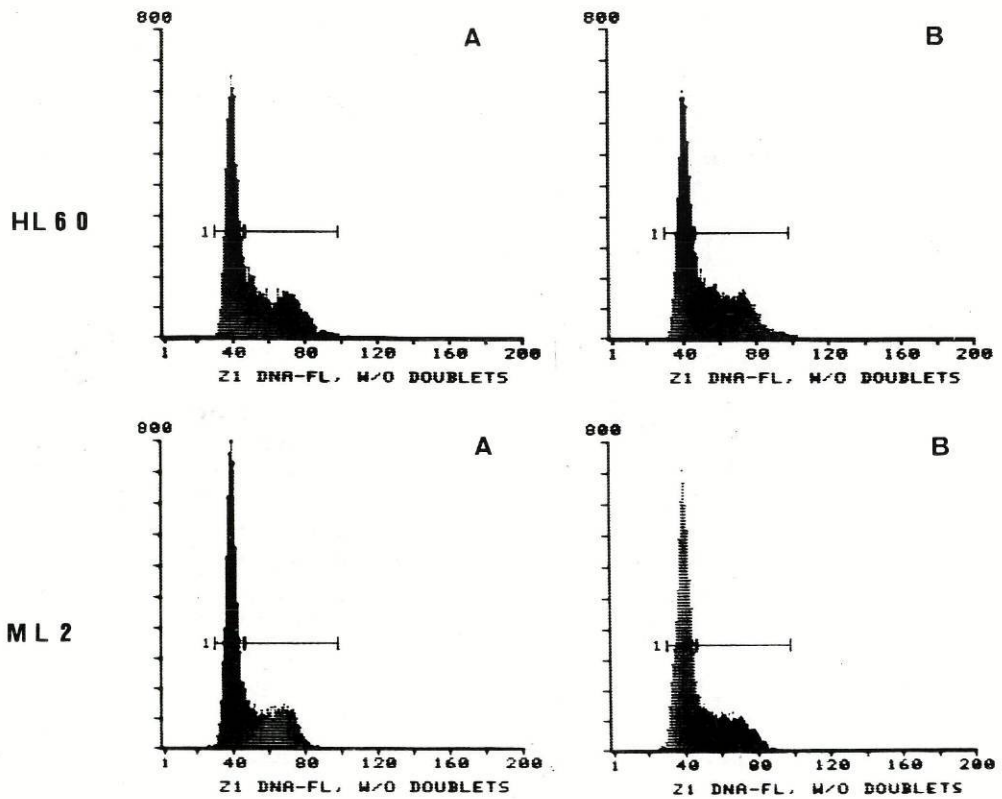


Fig. 31 - Perfis de fluorescência (brometo de etídio) das linhas celulares HL60 e ML2 cultivadas durante 24 horas na presença de 20 µg/ml de 42/6 (B) ou exclusivamente em meio de cultura (A). Em abcissas é representada a intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) e em ordenadas o número de células. O primeiro pico de cada gráfico corresponde a células 2N (G_1) e o segundo a células 4N (G_2 - M). A zona intermédia mede a percentagem de células em fase S. Percentagem de células de HL60 em fase S (média± erro padrão dos resultados de 2 experiências): Controle = 17.4 ±1.5%; 42/6 (5 µg/ml) = 24.6± 0.7%; 42/6 (20 µg/ml) = 21.6± 0.4%; DFX (10^{-5}M) = 22.2± 0.7%; HU (10^{-4}M) = 28.3%.

("fluorescence-activated cell sorter"). As células eram incubadas com um fluorocromo (brometo de etídio) que se fixa ao ADN e a intensidade de fluorescência revelada no FACS mede assim o conteúdo de ADN da célula. O perfil de fluorescência permite deste modo dividir as células em dois picos, 2N (G_1) e 4N (G_2-M), e uma zona intermédia entre o ADN diploide e o tetraploide (S).

Embora o número de experiências realizadas fosse pequeno, notava-se uma tendência (às 24h) para o aumento da proporção de células em fase S, nas culturas tratadas com o Atc 42/6 (20 e 5 µg/ml) e com DFX (10^{-5}M), com diminuição das células em G_2-M (Fig. 31). Este efeito era aparente quer em HL60 quer em ML2 e era semelhante, embora menos pronunciado, ao efeito obtido com HU (10^{-4}M). Esta última causava um aumento considerável de células em fase S, mas evidenciava uma diminuição do pico G_1, o que não se notava, pelo menos proeminentemente, nas culturas tratadas com 42/6 ou com DFX.

O aumento de células em fase S correlacionava-se com o aumento de incorporação de ^{3}H-TdR nas mesmas células.

Células leucémicas tratadas com o anticorpo anti-receptor da transferrina, com desferrioxamina ou com hidroxiureia são aparentemente bloqueadas na fase S do ciclo celular, com progressão deficiente para G_2-M

DISCUSSÃO

I - O GM-CSA INDUZ A DIFERENCIAÇÃO DE PROGENITORES MIELOIDES NORMAIS E ESTE EFEITO É DOSE-DEPENDENTE

A própria definição de GM-CSA (ou de GM-CSF) indica que está associado à diferenciação normal, pois estimula a formação de colónias de granulócitos e monócitos-macrófagos maduros.[23,238,291,292] Há assim 2 processos concomitantes e aparentemente indissociáveis: um processo de proliferação, com amplificação do número de células iniciais; e um processo de diferenciação das células estimuladas a dividir-se que leva à formação de células maduras terminais.

Há, no entanto, diversas questões a ter em conta. Em primeiro lugar, não se pode excluir a possibilidade de células mononucleares do sangue periférico (CMN-SP) produzirem vários factores solúveis com acções diversas sobre progenitores mieloides normais, mais especificamente de um (ou vários) factor(es) estimulante(s) da proliferação e de um (ou vários) factor(es) estimulante(s) da diferenciação. Isto mesmo é sugerido pelos trabalhos de I. Olsson e col., com a identificação e posterior purificação de um "differentiation-inducing factor", DIF, produzido por CMN-SP, possivelmente linfócitos T,[196] corroborados por estudos de outros cientistas.[201,293] No entanto, confirmou-se recentemente que o G-CSF purificado é capaz de induzir por si só a diferenciação celular.[96] Apesar desta prova, só a detalhada investigação do modo como o factor actua a nível celular permitirá confirmar ou desmentir a teoria de Leo Sachs segundo a qual proliferação e diferenciação granulomonocíticas são reguladas por factores distintos (MGI-1 e MGI-2 respectivamente) e que a estimulação do progenitor normal por MGI-1 o leva a produzir MGI-2.[192] Na célula leucémica, haveria uma dissociação ou desemparelhamento entre as duas fases deste mecanismo, permitindo que houvesse proliferação (embora nem sempre dependente, pelo menos na totalidade, da presença de factor de crescimento) na ausência de diferenciação. No entanto, não é fácil compatibilizar esta teoria com a indução de diferenciação de células mielomonocíticas murinas (WEHI-3) por G-CSF purificado. De uma maneira ou de outra, a resposta das células normais ao estímulo, tanto do ponto de vista proliferativo como do ponto de vista maturativo, é aparentemente síncrona com conjugação evidente dos dois processos.

No presente estudo, pretendeu-se estabelecer as características da resposta de

progenitores granulomonocíticos normais à actividade diferenciante do (ou contida no) GM-CSA. Verificou-se que a diferenciação em cultura aumentava proporcionalmente à concentração de CSA (medida pelo número de células mononucleares suas produtoras na camada nutritiva), de maneira análoga ao incremento de proliferação. Essa relação pode ser linearizada por meio de uma simples transformação do índice de maturidade utilizado (IM 1), proporcionando assim um modo de medir a resposta diferenciante e de a comparar com respostas de outras células, nomeadamente de células leucémicas. Observou-se ainda que progenitores granulomonocíticos de doentes com LMC exibiam uma capacidade de se diferenciarem em resposta ao estímulo aproximadamente normal e igualmente linear. Este facto facilita a comparação com células leucémicas, já que é possível criopreservar um número considerável de alíquotas de células de doentes com LMC, possibilitando assim melhor padronização das células-referência.

Apesar de a curva dose-resposta ser linear em grande parte da sua extensão, notou-se frequentemente perda de linearidade com baixas concentrações de CSA. As populações-alvo usadas incluiam células nos mais variados estadios de maturação. A um ritmo de diferenciação constante para as diversas células, precursores mais jovens levarão mais tempo a atingir o estadio terminal do que precursores mais maduros. Como o aumento de concentração de CSA vai recrutar progenitores progressivamente mais imaturos, a maturidade dos clones analisada num ponto-tempo fixo vai sofrer o efeito de dois vectores opostos: um que tende a aumentar a diferenciação celular com o aumento de concentração de factor diferenciante; e outro que causa o aparecimento de maior número de clones imaturos por recrutamento de progenitores mais precoces.

A existência de um *plateau* com altas concentrações de GM-CSA pode tão só ser explicada pelo não incremento de actividade diferenciante a partir de certas concentrações ou, alternativamente, por diluição deste efeito numa quantidade muito maior de células incapazes de se diferenciarem mais (já que a proporção de células ainda em maturação seria consideravelmente menor).

Progenitores normais e de Leucemia mieloide crónica proliferam e diferenciam-se em resposta ao GM-CSA. O número e a maturidade dos clones aumentam monotonamente com o aumento de CSA e estas relações podem ser linearizadas recorrendo a simples transformações logarítmicas.

II - DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO PRODUZEM ESTÍMULOS QUALITATIVAMENTE DIFERENTES

O GM-CSA é produzido por células mononucleares do sangue periférico. A influência de diferentes populações de CMN-SP na produção de estímulo proliferativo tem sido estudada, sendo geralmente aceite que os monócitos e os linfócitos são necessários à elaboração deste estímulo.[294,295]

No presente estudo, pretendeu-se investigar a acção de certas subpopulações de células T na produção de estímulo diferenciante e na relação deste com o estímulo à proliferação celular. Para o efeito, essas subpopulações foram selectivamente depletadas utilizando vários anticorpos monoclonais (Atc Mc) que reconhecem antigénios de membrana específicos de linfócitos T. Todos esses anticorpos são líticos com complemento de coelho e eliminam assim a população celular exibindo o respectivo antigénio. Os Atc Mc OKT3, MBG6 e OKT11a são anticorpos pan-T e as populações marcadas sobrepõem-se, embora não totalmente (fig. 32).

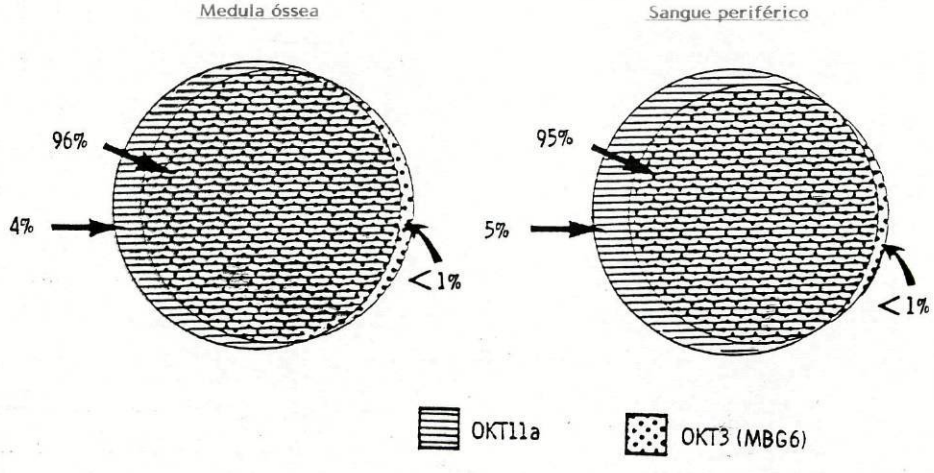


Fig. 32 - A população que possui o antigénio reconhecido pelo anticorpo OKT11a sobrepõe-se em larga escala, mas não é inteiramente idêntica, à população marcada pelos anticorpos OKT3/MBG6.

Quando células mononucleares de sangue periférico (ou nalgumas experiências de medula óssea) eram tratadas com a combinação de anticorpos OKT3 + MBG6 e complemento, eliminando deste modo cerca de 95% das células OKT3/MBG6 positivas, verificava-se que as células restantes (incorporadas em camadas nutritivas na concentração de $1x10^6$ cél.ml^{-1} (1) não estimulavam a diferenciação das células-alvo na mesma medida

(1) Para camadas nutritivas não tratadas, $1x10^6$ cél.ml^{-1} proporcionam estimulação máxima das células-alvo.

que células não tratadas, ou tratadas unicamente com anticorpo ou com complemento ou com líquido ascítico inespecífico. Os clones resultantes de progenitores assim estimulados eram mais imaturos do que os clones estimulados por camadas nutritivas controle. Este efeito não foi reproduzido pelo anticorpo OKT11a, que "marca" uma população quase inteiramente sobreponível, nem pelos anticorpos OKT3 ou MBG6 quando usados em separado. Uma possível explicação para este último facto é que o tratamento isolado com qualquer destes anticorpos (+C) não é tão eficaz como o tratamento com a combinação dos dois, permitindo a sobrevida de cerca de 13% de células OKT3/MBG6 positivas (ver Quadro II). A não reprodução do efeito descrito pelo tratamento com OKT11a + C tanto pode dever-se a relativa ineficácia do "killing" como a diferença marginal entre as populações marcadas, ocasionando a eliminação (ou sobrevida) de uma subpopulação minoritária necessária para (ou inibidora de) esse efeito (fig. 32).

O atraso maturativo não foi acompanhado por atraso proliferativo e não era, portanto, aparentemente devido a simples diminuição do estímulo (CSA). O número de clones formados na camada superior era aproximadamente constante a partir do 3º dia de cultura e não se notaram diferenças significativas entre as culturas estimuladas por camadas nutritivas depletadas de células OKT3/MBG6 positivas e os controles. Esta observação é corroborada pelo facto de o tamanho dos clones não ser inferior nas culturas em que se usou o tratamento com OKT3/MBG6 + C. Pelo contrário, a partir do 6º dia os clones nestas culturas tendiam a conter mais células que os clones das culturas controle. O mesmo se verificou nas culturas em que as camadas nutritivas eram tratadas com RFT8 + C. A explicação mais óbvia para este facto é que, devido à maior demora no processo de maturação, as células permanecem mais tempo com capacidade de divisão. Isto mesmo é confirmado pelas experiências de "recloning", em que as células clonais de culturas estimuladas por camadas tratadas com OKT3/MBG6 + C têm capacidade clonogénica superior à das células recultivadas a partir de culturas controle.

O atraso maturativo causado por camadas nutritivas depletadas de células OKT3/MBG6 positivas era reproduzido quando, no lugar desses anticorpos, se utilizava o anticorpo RFT8. A depleção com RFT8 + C originava maior imaturidade dos clones e a resposta de progenitores GM (medida por um índice de maturidade) ao aumento de concentração de células RFT8-depletadas (na camada nutritiva) era inferior à resposta ao estímulo normal. Nestas experiências, observou-se reforço proliferativo nas culturas em que se procedia à depleção de células RFT8+ (tanto no tamanho como no número de clones e no seu aumento em resposta a incrementos de concentração do estimulante). É sugestivo que com iguais concentrações de células na camada nutritiva, as camadas depletadas de células T8+ induziam a formação de clones maiores e mais numerosos. Este facto pode dever-se a atraso no trânsito de células de um compartimento com capacidade proliferativa para um compartimento de células terminais sem capacidade de divisão, privilegiando assim a possibilidade de ocorrência de mais um processo mitótico

antes da esterilização da célula em termos proliferativos.

Também a adição de células OKT8+ a camadas nutritivas depletadas de células OKT3/MBG6+, revertia o efeito sobre a diferenciação obtido com o tratamento com estes dois últimos anticorpos, restabelecendo o nível de diferenciação obtido nas culturas controle. No entanto, a adição de células OKT4+ a essas camadas nutritivas não produzia qualquer efeito, continuando a observar-se atraso maturativo.

Estes dois tipos de experiências parecem confirmar que a subpopulação envolvida na obtenção deste efeito é T8+ (correspondente em termos funcionais à subpopulação T citotóxica/supressora). Este facto sugere que este tipo de células poderá segregar um factor indutor da diferenciação ou de algum modo estar envolvido na sua elaboração. É interessante a observação, em doentes granulocitopénicos, de uma associação entre neutropenia e o aumento, na medula óssea, de células OKT3+, OKT8+, OKT4-;[296,297] entretanto, células destes doentes formam colónias GM em número normal quando lhes é fornecido factor estimulante exógeno[296] ou quando a medula é depletada de células T.[297] Estas observações vêm de encontro aos resultados deste estudo, sugerindo que o aumento do número (e actividade) de células T8 positivas iria promover preferencialmente a diferenciação celular, rompendo assim o equilíbrio entre proliferação e diferenciação e levando a falência medular.

Os linfócitos T têm um papel reconhecido na produção de factores estimulantes[298-301] e inibidores[302,303] da hemopoiese e foram implicados na génese da anemia aplástica e do síndrome de Blackfan-Diamond por mecanismo auto-imune.[304-307] Entre os linfócitos T têm sido isoladas subpopulações com efeito estimulante ou inibidor da hemopoiese quer por CFE ("counterflow elutriation"),[308] quer por marcação imunológica. A subpopulação T com fenótipo supressor/citotóxico (T8+, Leu2+ ou Fcγ +) tem sido implicada na inibição da granulopoiese[309] e da eritropoiese,[310] nesta aparentemente sob restricção HLA-DR (1).[311] Células OKT8 positivas produzem uma actividade capaz de inibir a produção de CSF por células T4 positivas.[315] Outros autores estendem o efeito supressor da granulopoiese às "NK cells" ("natural killer cells").[316-318] Estas células, identificáveis morfologicamente como "large granular lymphocytes" e também Fcγ +,[319-321] são capazes de reconhecer progenitores hemopoiéticos[322,323] e a sua actividade está reduzida em doentes pré-leucémicos com alterações visíveis do equilíbrio proliferação/diferenciação.[324,325] O efeito citotóxico anti-tumoral das "NK cells" é aparentemente mediado pelo reconhecimento do receptor da transferrina nas células-alvo.[262] No entanto, parece existir certa heterogeneidade funcional entre subpopulações de "NK cells" no que diz respeito à produção de linfoquinas.[326]

(1) Estas observações são, no entanto, contestadas por outros cientistas que referem aumento da actividade proliferativa por co-incubação da medula com células OKT8+,[312] por estímulo gerado pela co-incubação de células OKT8+ e monócitos autólogos na presença de mitogénio[313] ou pelo estímulo produzido por células Ly2,3+ (supressoras/citotóxicas) activadas por Concanavalina A.[314] Esta discrepância poderá eventualmente ser explicada por diferenças em metodologia.

A importância das células T na regulação da hemopoiese é também realçada pelo uso, com sucesso, de ALG ("anti-lymphocyte globulin") ou de ATG ("anti-thymocyte globulin") no tratamento de anemias aplásticas.[327-330]

Tanto a ALG como a ATG parecem ter efeitos pan-T, bloqueando antigénios relevantes destas células;[331] nesse estudo, também se observou que as concentrações de ALG ou ATG necessárias para bloquear o atg CD8 marcado pelo atc anti-Leu 2a (que reconhece a subpopulação supressora/citotóxica) são marcadamente inferiores às concentrações bloqueantes do atg CD4 (1) marcado pelo atc anti-Leu 3a (que reconhece a subpopulação "helper"), o que parece indicar maior especificidade para a população citotóxica/supressora. Curiosamente, nenhuma das três preparações comerciais testadas nesse estudo parece bloquear o atg Leu 7 (característico de "NK cells") ou o receptor para a IL2 (2).

Haverá uma possível exploração futura do uso de Atc Mc no tratamento da anemia aplástica e de outras citopenias imunes, em lugar dos heteroantisoros ALG e ATG, com as vantagens decorrentes da maior especificidade e diminuição de complicações alérgicas. No único estudo que conhecemos até à data, Atc Mc anti-T foram claramente menos eficazes que a ATG, a ponto do ensaio ter sido interrompido.[335] No entanto, nenhum dos anticorpos utilizados era dirigido especificamente contra a subpopulação citotóxica/supressora, o que pode estar na origem da ausência de efeito. Por outro lado, a administração *in vivo* de Atc Mc está ainda longe de atingir os efeitos a que se propõe, por falência de mecanismos mediadores da acção imunológica, por deficiente (ou ausente) fixação de complemento humano e por existência de modulação antigénica (revisto em Guimarães, 1987).[336]

O conjunto de observações do presente estudo substancia a hipótese da regulação homeostática do número de células maduras funcionais, de acordo com as necessidades do organismo em dado momento. Diferenças qualitativas do estímulo (originadas no envolvimento selectivo de diferentes populações celulares) condicionariam maior ou menor amplificação do sistema hemopoiético, ao favorecerem a proliferação ou a diferenciação celulares, respectivamente (fig. 33).

Em condições normais, num sistema para cultura de CFU-GM, proliferação e diferenciação aparecem intimamente interligadas e factores que estimulam a proliferação

---

(1) CD - "cluster of differentiation" - corresponde a uma nova taxonomia de atg leucocitários (estabelecida nas Workshops on Leukocyte Differentiation Antigens realizadas em Paris, 1982, Boston, 1984 e Oxford, 1986) que procura estabelecer uma classificação que obste à confusão originada pela proliferação de nomes tão diversos e frequentemente hieroglíficos dos anticorpos que os reconhecem. CD8 = antigénio específico da população S/C. CD4 = atg específico da população "helper".[332]

(2) IL2 ("interleukin 2") = TCGF ("T cell growth factor") é o factor de crescimento que promove a proliferação (induzida por antigénio ou mitogénio) dos linfócitos T maduros.[333,334]

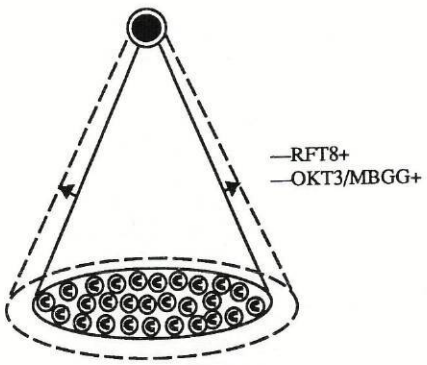


Fig. 33 - Modelo de amplificação da granulopoiese por acção de subpopulações linfocitárias T: a remoção de uma população OKT3/MBG6+, T8+ amplifica a granulopoiese, ao atrasar a maturação celular *in vitro*. Este pode ser um dos mecanismos pelos quais o organismo regula a produção de células maduras funcionais.

induzem igualmente a diferenciação celular. Neste estudo se demonstra, ao que julgamos pela primeira vez, que a diferenciação pode ser parcialmente dissociada da proliferação em progenitores GM normais.

Este facto é susceptível, no futuro, de exploração experimental e possivelmente terapêutica.

A remoção selectiva de certa(s) subpopulação(ões) T atrasa a diferenciação celular em cultura sem atraso proliferativo significativo. Este atraso de maturação vai prolongar o período durante o qual as células têm capacidade mitótica, aumentando assim a sua progenia. Experiências usando citotoxidade mediada pelo complemento e posterior restituição de populações seleccionadas permitem concluir que a população responsável pelo efeito selectivo na diferenciação é OKT3/MBG6+, OKT8(RFT8)+, OKT4-. A dissociação induzida entre diferenciação e proliferação celulares permite modificar a amplificação do sistema hemopoiético e tem implicações importantes para o estudo do comportamento das células leucémicas.

III - CÉLULAS DE LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA RESPONDEM À ACTIVIDADE DIFERENCIANTE DO GM-CSA: A RESPOSTA É DOSE-DEPENDENTE E VARIÁVEL DE CASO PARA CASO

A SENSIBILIDADE AO ESTÍMULO PROLIFERATIVO ESTÁ TAMBÉM ALTERADA, MAS AS RESPOSTAS PROLIFERATIVA E DIFERENCIANTE VARIAM INDEPENDENTEMENTE UMA DA OUTRA

A MEDULA LEUCÉMICA PODE TER ACTIVIDADE DIFERENCIANTE ENDÓGENA, SUSCEPTÍVEL DE SER MEDIDA

Na granulopoiese normal, há portanto uma associação entre proliferação e diferenciação que pode ser parcialmente rompida ou relaxada. O aumento da amplificação do sistema conseguido por alteração qualitativa do estímulo exógeno pode simular marginalmente a condição leucémica.

Na leucemia aguda mieloblástica, o equilíbrio proliferação/diferenciação está marcadamente alterado pelo crescimento clonal de uma "stem cell" defeituosa que perde parcial ou completamente a capacidade de se diferenciar. Vários autores têm defendido a ideia de um bloqueio de maturação, segundo a qual a diferenciação leucémica não ultrapassaria um (pré)determinado estadio, levando a acumulação de células a esse nível de maturação.[230,231] O fenótipo celular predominante revelaria o estadio a que se dá o bloqueio de maturação.[231] Haveria no entanto a possibilidade de ultrapassar esse bloqueio pelo uso de substâncias, quer fisiológicas (CSF, DIF e análogos vitamínicos) quer farmacológicas, capazes de induzir a diferenciação de células leucémicas *in vitro*.[230]

Foi tendo em vista essencialmente o caso das neoplasias linfoides que o conceito de bloqueio de maturação ganhou aceitação (1).[231] Nestas leucemias, os passos de diferenciação estão menos demarcados e individualizados que nas leucemias mieloides. Morfologicamente, os estadios de diferenciação e as várias estirpes celulares linfoides podem resumir-se a 3 ou 4 tipos celulares principais: o linfócito quiescente que tanto pode ser pré-T como pré-B, T ou B periférico ou célula não-T não-B; o linfócito activado, em proliferação, com características blásticas; o plasmócito; e o "large granular lymphocyte", LGL, identificado com a célula com actividade citotóxica natural, a "natural killer cell" (NK cell). A caracterização antigénica e funcional das populações celulares veio, no entanto, separá-las em diversos subtipos funcionais e vários estadios de maturação.

O conceito de bloqueio de maturação parece, no entanto, um pouco simplista por várias ordens de razões:

a) Em primeiro lugar, a população leucémica visível raramente é homogénea — sobretudo no sistema mieloide é mais aparente e mais óbvia a frequente

(1) O conceito de bloqueio de maturação de Lotem & Sachs refere-se fundamentalmente a um bloqueio funcional.

heterogeneidade fenotípica da população leucémica. A coexistência de células em vários estadios de maturação não pode ser atribuida exclusivamente à presença de células normais residuais, já que com frequência as células maduras expressam características morfológicas (ex. pseudo-pelger em leucemias e síndromes mielodisplásicos[337-339]), funcionais (ex. deficiência de lactoferrina e mieloperoxidase, na LMC e leucemias agudas;[149-152] reduzida actividade fagocítica[340]) e citogenéticas (ex. cromossoma de Philadelphia na LMC[341,342]) que são altamente sugestivas ou mesmo demonstrativas da sua filiação no clone leucémico.

A heterogeneidade fenotípica das leucemias é difícil de explicar à luz do conceito de "bloqueio de maturação".

b) O aspecto monótono e homogéneo das linhas celulares leucémicas foi outra das observações que induziu a teoria do bloqueio de maturação.[230,343] No entanto, nem estas são inteiramente homogéneas, pois existe geralmente uma pequena percentagem de células total ou parcialmente diferenciadas, nem são representativas da dinâmica leucémica *in vivo* (tanto porque não existem muitas das condicionantes desta como porque resultam da provável transformação em laboratório das células iniciais levando a propagação virtualmente interminável).

c) Finalmente, a transformação leucémica ou blástica de doenças proliferativas previamente com diferenciação aproximadamente normal ou de qualquer modo considerável, só pode ser explicada, à luz deste conceito, pela emergência de um novo clone com bloqueio a nível diferente. Isto é dificilmente compatível com a ocorrência, não rara de todo em todo, de uma evolução arrastada e gradual (observável principalmente em síndromes pré-leucémicos) para o estado francamente leucémico.

Embora o desencadeamento da crise blástica seja frequentemente acompanhado pelo aparecimento de novas alterações cromossómicas, a alteração inicial geralmente mantém-se, demonstrando que o clone inicial foi apenas sujeito a nova transformação que lhe modificou as características e capacidade funcional.[344-346]

Por outro lado, é frequente uma crise blástica de LMC ser linfoide, megacariocítica ou eritroide, dando-se assim um salto de uma linhagem para outra. Dado que a probabilidade de ocorrência de duas mutações "random" e desligadas uma da outra, no mesmo doente, é extremamente pequena, este facto só pode ser explicado pelo encadeamento de eventos carcinogénicos: a "stem cell" alvo da primeira transformação tornar-se-à, por via desta, particularmente susceptível a alterações carcinogénicas ulteriores.

Estas observações são mais facilmente explicáveis por uma alteração da probabilidade da célula para proliferar (a que se pode chamar pP) e se diferenciar (pD). Em células normais, estas probabilidades estão harmonicamente concertadas, embora possam ser modificadas por regulação do organismo (ver Pontos I e II desta Discussão), provavelmente segundo as necessidades deste. Na célula leucémica, o ritmo proliferativo não está aumen-

tado, pelo contrário ela prolifera a um ritmo igual ou mais lento que o progenitor normal.[347] Pode portanto considerar-se que a probabilidade de proliferação (pP) da célula leucémica é igual ou mesmo inferior à da sua contraparte normal. Mas a probabilidade de diferenciação (pD) é consideravelmente menor e, por isso, poucas células atingem a maturidade plena e a população leucémica não se exaure por morte terminal, continua a ter capacidade de divisão e prolifera até aos limites físicos do organismo (fig. 34).

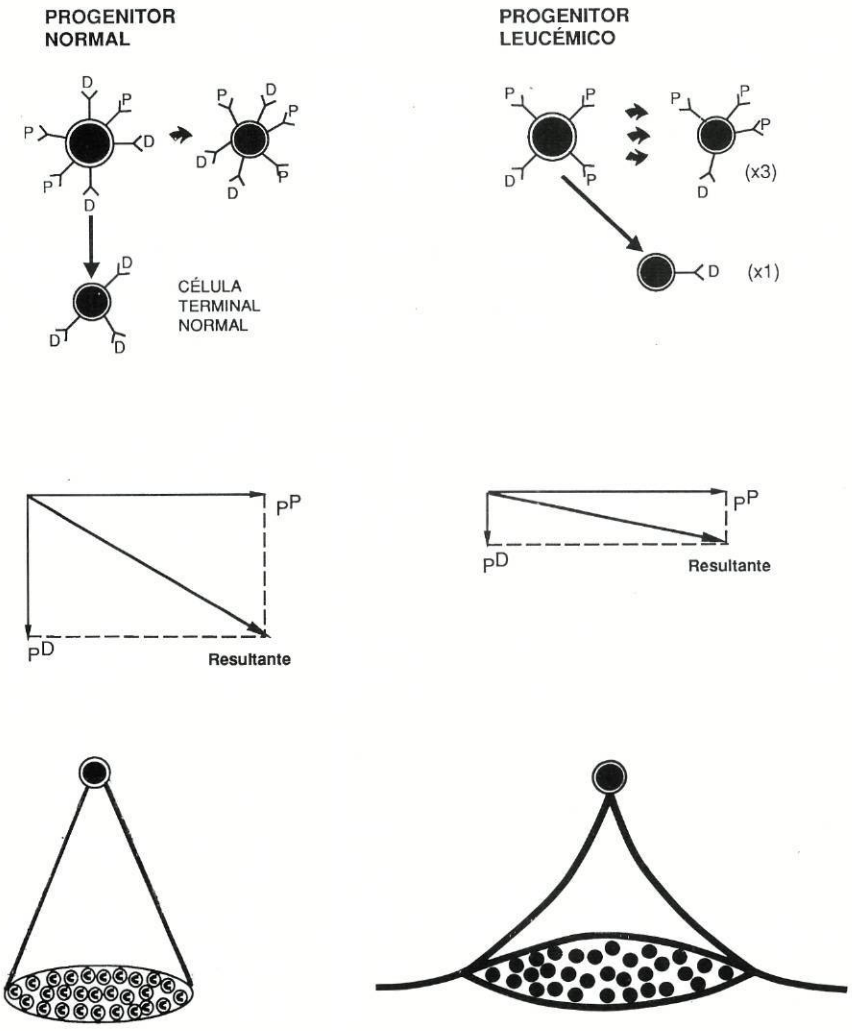


Fig. 34 - Equilíbrio proliferação/diferenciação na granulopoiese normal e leucémica. No painel superior, representa-se um progenitor normal com iguais probabilidades de proliferar ou se diferenciar (simbolizado por receptores de membrana para factores proliferativo e diferenciante) e um progenitor leucémico que não tendo maior probabilidade de proliferação (por unidade de tempo) tem muito menor probabilidade de diferenciação. O vector resultante das probabilidades de proliferação (pP) e de diferenciação (pD) está assim deslocado no sentido da proliferação (painel do meio). Por isso, a grande maioria da progenia leucémica não atinge o estadio de maturação terminal, acumulando-se em estadios indiferenciados ou intermédios que conservam capacidade proliferativa. O resultado é uma amplificação virtualmente infinita da progenia (painel inferior).

Esta hipótese é fortemente sugerida pelo presente estudo. Se a indução de diferenciação fosse um problema de vencer um bloqueio, era natural que a reacção celular ao indutor fosse de "tudo ou nada". O facto de a diferenciação das células de LAM aumentar monotonamente com o estímulo diferenciante favorece consideravelmente a tese de um modelo probabilístico.

Este estudo põe também em causa a tese de um modelo puramente estocástico para a opção diferenciação/auto-renovação.[8,69] Os actuais resultados são, com efeito, favoráveis à existência de um modelo probabilístico, em que a probabilidade é modulada por influências ambienciais (humorais ou do microambiente hemopoiético). Ou seja, um progenitor normal terá à partida probabilidades idênticas de proliferar ou de se diferenciar (ilustrado na fig. 34 por receptores para proliferação, P, e diferenciação, D), mas a proporção relativa de moléculas exógenas estimulantes da proliferação ou da diferenciação (ou outras influências como contacto célula-célula) irá condicionar, probabilisticamente, um ou outro evento. Na LAM, a alteração radical da probabilidade intracelular de maturação tornaria o progenitor muito pouco sensível a estímulos diferenciantes presentes no meio extracelular. A probabilidade de proliferação, enquanto acontecimento/fracção de tempo, não estaria aumentada, mas como a diferenciação é muito menos provável, a célula permaneceria muito mais tempo com potencial proliferativo, dando lugar a amplificação virtualmente infinita da progenia.

O facto de a diferenciação das células leucémicas poder aumentar em resposta a um factor diferenciante exógeno (e de uma forma dose-dependente) contribui para reforçar a ideia de que a diferenciação não é um acontecimento puramente estocástico, mas depende da interacção de probabilidades interna e externa.

O presente estudo sugere igualmente que células leucémicas de diferentes doentes têm probabilidades diferentes de entrarem num processo de maturação terminal. A probabilidade de diferenciação leucémica será assim possivelmente a resultante da interacção de factores internos (defeito da normal maquinaria celular com deficiente processamento do sinal externo) e exteriores à célula (concentração de estímulo diferenciante no ambiente hemopoiético) e condicionará porventura o grau de maturação atingido *in vivo*. Esta hipótese explicaria assim o aparecimento de LAM com estadios de maturação variados (M1 - M2 ou M4; M5a - M5b).

Os 7 casos analisados na altura da apresentação evidenciavam, todos eles, diferenciação claramente anormal, o que sugere que pelo menos a maioria dos clones formados em cultura descendia de progenitores leucémicos e não de progenitores normais residuais. A corroborar esta observação, verificou-se o facto de nenhuma destas culturas conter colónias de tamanho normal (≥ 40 células) mas somente "clusters" (2-39 células), o que é típico do crescimento de células leucémicas em agar.[173,176] O padrão de crescimento em micro ou macroclusters sugere que a presença de células normais residuais é escassa e o seu crescimento irrelevante. Poder-se-à assim interpretar, com certo grau de confian-

ça, que as curvas dose-resposta reflectem genuinamente a variação de comportamento das células leucémicas.

A maioria das células de LAM eram menos sensíveis ao CSA que as células-referência: seis das 7 amostras colhidas na altura do diagnóstico tinham P-SF menor que 1. Só as células do doente B tinham P-SF > 1 (sensibilidade igual ou superior à das células-referência). Embora este facto, só por si, não indique que as células leucémicas têm um ritmo proliferativo inferior, pois pode haver relativa insensibilidade ao tipo de actividade (CSA) que estimula células normais, é mais um argumento a favor de uma maior lentidão proliferativa das células leucémicas em relação às suas equivalentes normais. Como se poderia esperar, 6 dos 7 doentes tinham resposta diferenciante inferior à das células-referência (D-SF < 1). Em 4 doentes, a sensibilidade ao estímulo diferenciante era menor que ao estímulo proliferativo (D-SF < P-SF). Surpreendentemente, no entanto, em 2 doentes (A e C), o D-SF era marcadamente superior ao P-SF. Embora o número de doentes estudados e a heterogeneidade da amostra (em apresentação e modalidade terapêutica) não permitam tirar conclusões firmes, este facto pode ser relevante já que os doentes A e C foram aqueles que obtiveram remissões completas mais longas (> 85 meses e > 33 meses). Pelo contrário, o doente F, com D-SF ligeiramente superior ao P-SF, não entrou em remissão (apesar de ter experimentado considerável redução da carga blástica com a terapêutica), o que se pode dever ao facto de esta leucemia ter sido precedida de síndrome mielodisplásico e pertencer, por isso, a um grupo com considerável resistência ao tratamento.[348] Não se observou, no entanto, correlação significativa entre D-SF e obtenção ou duração de remissão completa na amostra estudada, embora os casos A e C possam ser sugestivos e despertem interesse e curiosidade numa eventual extensão deste estudo.

O facto do D-SF ser superior ao P-SF nalguns casos não significa que *in vivo* a diferenciação seja favorecida sobre a proliferação celular. O facto de a inclinação das curvas ser igual ou superior à das células-referência não indica que a capacidade de diferenciação seja semelhante. Nos doentes A, C e F, com inclinações das curvas-teste iguais ou superiores às das curvas-controle, as regressões estão largamente separadas indicando que, com qualquer concentração do estímulo diferenciante, as células-referência atingem grau de diferenciação muito maior que as células-teste. Um único caso há, em que as regressões das células-teste e referência são sobreponíveis. É no doente H, mas nesse caso as células-teste cultivadas correspondiam provavelmente a células normais regenerativas e não é de estranhar que elas respondam ao estímulo diferenciante de forma semelhante às células-referência.

Em 2 medulas testadas, verificou-se existir um estímulo diferenciante endógeno, produzido pela própria medula leucémica. Tanto quanto se sabe, a existência desse estímulo é aqui pela primeira vez demonstrada. As características da resposta a este estímulo são idênticas às da resposta ao estímulo exógeno, como se pode deduzir pela linearidade

e pelo deslocamento paralelo de uma curva em relação à outra. O estímulo adicional fornecido pelas $1.5x10^5$ células medulares a mais é equivalente ao estímulo produzido por $6.4x10^5$ e $3.4x10^5$ (respectivamente para os doentes E e H) células mononucleares de sangue periférico na camada nutritiva. O facto de o número de células da medula leucémica necessário para produzir esse estímulo ser menor que o de células mononucleares poderá não ter significado, dado as populações envolvidas serem dissemelhantes e estarem topograficamente situadas a nível diferente (CMN-SP na camada nutritiva, células da medula leucémica na própria camada-alvo).

A diferenciação atingida *in vivo* (avaliada por um IM *in vivo*) poderá assim ser função não só da capacidade intrínseca da célula leucémica para se diferenciar, mas também da presença e quantidade do estímulo diferenciante endógeno. Isto mesmo parece acontecer no doente D cujo incremento de diferenciação em resposta ao estímulo exógeno foi muito pequeno mas que, em contrapartida, tinha boa diferenciação basal (dependente só do estímulo endógeno), a qual condicionava provavelmente o nível de diferenciação observado *in vivo*. No caso do doente F, a diferenciação basal era reduzida, levando a conjecturar que o estímulo endógeno era pequeno, mas que as suas células evidenciavam razoável capacidade para se diferenciarem em resposta ao estímulo exógeno.

Células de medula óssea (ou sangue periférico) de doentes com Leucemia aguda mieloblástica respondem diferenciando-se a estímulo(s) exógeno(s). Esta resposta varia de caso para caso. Os clones formados a partir destas células nunca têm no entanto nível de maturação comparável ao de clones normais. As medulas leucémicas contêm também uma actividade (de iguais características às do estímulo exógeno) capaz de influenciar a diferenciação celular. Esta actividade endógena é provavelmente responsável (ou co-responsável) pelo grau de diferenciação presente *in vivo*. Estas conclusões favorecem a existência de um modelo probabilístico para a opção proliferação/diferenciação, segundo o qual uma probabilidade diminuída de diferenciação é responsável pela imaturidade da população leucémica, pela sua heterogeneidade e pelo crescimento contínuo ocasionado pela ausência (ou deficiência) de maturação terminal. A probabilidade de diferenciação resultará da interacção de factores intracelulares e extracelulares.

IV - PROGENITORES NORMAIS E LEUCÉMICOS RESPONDEM A UMA VARIEDADE DE AGENTES INDUTORES DE DIFERENCIAÇÃO DESENVOLVENDO CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DE CÉLULAS MADURAS E PERDENDO POTENCIAL PROLIFERATIVO

INIBIDORES DA SÍNTESE DE ADN INTERACTUAM SINERGISTICAMENTE COM OUTROS AGENTES INDUTORES NA PROMOÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Os pontos anteriores permitiram a formulação de várias conclusões que tiveram importância prática na elaboração e "design" experimental destes estudos:

- as células leucémicas estão sujeitas *in vivo* a um estímulo diferenciante que poderá ser uma das condicionantes do grau de maturação atingido;

- são capazes, pelo menos na maioria dos casos, de responder ainda supletivamente a um estímulo diferenciante exógeno;

- este estímulo exógeno actuará, por meio de diversos mecanismos, sobre a probabilidade de diferenciação celular, aumentando-a.

São numerosas as descrições na literatura de indução de diferenciação de células leucémicas, quer primárias (*ex vivo*) quer de linhas celulares estabelecidas. Todavia os mecanismos pelos quais os indutores de diferenciação actuam são ainda, pelo menos parcialmente desconhecidos. Pode-se postular para os inibidores da síntese de ADN e anti-metabolitos um mecanismo comum que tem a ver com a sua interacção com o ciclo celular.[349] Alguns destes agentes causam porém um distúrbio do metabolismo purínico que leva a um desiquilíbrio da produção de GTP[212,280,350-352] e alguns autores especulam com a possibilidade de a indução de diferenciação ter ligação com o facto de alguns oncogenes (nomeadamente o Ha-ras-1 e o Ki-ras-2) terem como propriedades conhecidas a fixação ao GTP e actividade de GTPase,[353] assim interferindo no metabolismo dos nucleotídeos cíclicos.[354] No entanto, o oncogene v-Ha-ras mantém o seu nível de expressão constante quando a linha promielocítica HL60 é induzida a diferenciar-se (embora por outros agentes), ao contrário de outros como o v-myc e v-myb cuja expressão diminui (1).[355-357]

Em relação aos forbol ésteres e teleocidinas, a indução de diferenciação é mediada por um receptor ao qual está associada a proteína quinase C.[359] Os compostos plano-polares (dimetilsulfóxido, hexametilenobisacetamida, butirato, etc.) influenciam a permeabilidade da membrana citoplasmática, são eles próprios permeáveis através da célula e podem reagir com as pontes de hidrogénio do ADN através do par de electrões livres que possuem.[343,360] Também podem causar alterações conformacionais da croma-

(1) A expressão diferencial de oncogenes durante a diferenciação hemopoiética (e em outros orgãos e tecidos) sugere que certos oncogenes (como o Ha-ras e o abl), devido à sua expressão quase universal, estarão provavelmente envolvidos em funções celulares básicas, enquanto que outros (como o c-sis, o c-myb e possivelmente o c-myc) poderão ter importância em estadios específicos da diferenciação.[358,343]

tina.[361] Outros agentes poderão actuar por diminuição de metilação do ADN (inibidores da DNA-metiltransferase: 5-azacitidina,[362-364] L-etionina[365]), por ligação ao ADN (corticoides[366]) ou por intercalação neste (bromodeoxiuridina, BrUdR[367,368]). Foi proposto que "DNA-binding proteins" podem comandar ou modular a expressão de genes.[369]

Neste estudo, pretendeu-se investigar os mecanismos que presidem à diferenciação hemopoiética normal, através da indução de maturação de células leucémicas e normais por diferentes agentes. O efeito destes agentes ou de combinações dos mesmos sobre a diferenciação leucémica poderia deste modo lançar luz sobre as alterações qualitativas que impedem estas células de sofrer uma maturação normal.

Foram usadas células normais e células colhidas de doentes com síndrome mielodisplásico (SMD) e LAM refractária. Ao contrário das células de linhas leucémicas estabelecidas, os SMD (e em menor grau as LAM) têm células em diversos estadios de maturação, mais conformes portanto ao modelo probabilístico proposto anteriormente (Ponto III). Os SMD são caracterizados por citopenias periféricas, geralmente associadas a medula óssea hipercelular. Isto sugere um processo de maturação deficiente com atraso maturativo *in vitro*,[370,371] mas as células destes doentes retêm muitas das propriedades da proliferação e diferenciação normais e podem assim ser susceptíveis a meios capazes de alterar o normal equilíbrio proliferação/diferenciação. As culturas de SMD são reminiscentes da alteração da amplificação do sistema conseguida pelo estímulo produzido pela deplecção de células OKT3/MBG6+ ou de células RFT8+ (Ponto II), em que o atraso maturativo conduzia a um aumento da amplificação por permitir mais divisões celulares. É curioso relembrar que tem sido descrita deficiência de células T8+ em síndromes pré-leucémicos.[325,372]

As células de doentes pré-leucémicos respondem a concentrações 0.1 mM de 6-MP desenvolvendo a capacidade de reduzir o NAT e perdendo potencial proliferativo (1). Este efeito não parece ser predominantemente citotóxico, já que a concentração utilizada de 6-MP não se mostra capaz de igual efeito supressor nas culturas primárias, embora esta acção varie de doente para doente. Em células normais, o efeito dessa concentração (0.1 mM) de 6-MP é também só ligeiramente citotóxico. A maturidade dos clones das culturas primárias também aumenta em resposta à 6-MP e em menor grau à N-MF ($3x10^{-2}$M).

No entanto, efeito semelhante ou até superior pode ser observado quando à 6-MP, em concentrações 10 ou mesmo 100 vezes inferiores (10^{-5} M e 10^{-6} M), é associado outro indutor de diferenciação, a N-MF (em concentrações de $3x10^{-3}$ M e $3x10^{-2}$ M, respectivamente, incapazes só por si de provocar diferenciação significativa *in vitro*). As combinações destes 2 agentes indutores têm marcados efeitos sinergísticos na diferen-

---

(1) A redução do número de células clonogénicas em culturas de suspensão é a medida mais sensível de indução de diferenciação. Concentrações de agentes que não aumentam a percentagem de células NAT+ ou esterase+ são contudo suficientes para reduzir significativamente o número de células clonogénicas em suspensão.

ciação, mas em termos de toxicidade para as células clonogénicas os efeitos são só aditivos.

Este efeito sinergístico na diferenciação celular pode ser observado com diferentes combinações dos vários inibidores da síntese de ADN (6-MP, citosina arabinosídeo, afidicolina) com indutores de diferenciação doutro tipo, como a N-MF e o ácido retinoico. Por outro lado, combinações de dois inibidores da síntese de ADN (p. ex., 6-MP e APH) têm efeito meramente aditivo, o que sugere um mecanismo de acção comum.

A resposta é variável de doente para doente, traduzindo a heterogeneidade do grupo em estudo. Células de alguns doentes respondem melhor ao inibidor da síntese de ADN e as de outros à N-MF ou ao RET. Mas em todos os 19 doentes estudados, foi possível em alguma medida induzir a diferenciação das suas células. Isto contraria observações de alguns autores segundo os quais só uma pequena proporção de LAM e SMD responderia aos retinoides.[373-375] Outros autores, no entanto, chegaram a resultados semelhantes aos deste estudo,[376,377] pelo que a discrepância de resultados se deve provavelmente a diferenças na metodologia (há, por exemplo, SMD cujas células não aumentam a sua capacidade de reduzir o NAT em resposta a concentrações de 10^{-6} - 10^{-7} M RET, mas revelam uma diminuição de potencial clonogénico que é, como se viu, uma medida mais sensível de diferenciação). É de igual modo questionável a afirmação de que só células leucémicas no estadio de promielócito são capazes de diferenciação em resposta aos retinoides.[343,374,375]

A extensão da diferenciação produzida por estes agentes poderá estar dependente do nível de estímulo diferenciante endógeno presente nas medulas estudadas. A acção diferenciante da 6-MP era menor sempre que a estimulação das culturas por GM-CSA exógeno era submáxima. Este facto sugere que os inibidores da síntese de ADN também actuam sinergisticamente com o DIF. Entretanto foi demonstrado recentemente que o DIF actua sinergisticamente com o ácido retinoico.[206] Estas duas observações indicam que este estímulo diferenciante fisiológico tem um mecanismo de acção diferente dos dois tipos de compostos estudados (6-MP e RET). Agentes capazes de aumentar o nível de cAMP intracelular (PGE_2, choleratoxin) e o ATP (e outros nucleosideotrifosfatos) também actuam sinergisticamente com o ácido retinoico,[378,379] facto que pode ter a ver com reacções de fosforilação da membrana. O tratamento de HL60 com RET aumenta, de forma dose-dependente, a proteína quinase I dependente do cAMP.[378] O ácido retinoico poderá actuar, pela sua reconhecida capacidade de glicosilação das proteínas de membrana, modulando o número e a afinidade de receptores para factores de crescimento e moléculas com acção diferenciante.[343] É de realçar que o ácido retinoico aumenta o crescimento clonal de "stem cells" normais em resposta ao CSF[380] e à eritropoietina.[381] Inversamente, reduz o crescimento clonal de células leucémicas.[382] Os retinoides são ainda capazes de induzir a diferenciação de linhas celulares de teratocarcinoma;[383] e inibem a transformação e crescimento de linhas tumorais e a carcinogé-

nese em modelos animais.[384]

O sinergismo de acção resulta do facto dos agentes em causa actuarem por vias diferentes, de modo a que um potencie o outro. A combinação de agentes actuando na mesma via só poderá ter efeitos aditivos. Em relação ao sinergismo RET/DIF, RET/factor de crescimento ou RET/cAMP foi postulado que o RET poderia aumentar o número e afinidade de receptores de membrana para estes agentes.[343] No que toca ao sinergismo observado entre inibidores da síntese de ADN e ácido retinoico é menos provável, embora não de excluir, um mecanismo semelhante. Tem sido reunida evidência experimental para a existência de uma "janela" no ciclo celular (na fase S ou S-G_2-M) particularmente sensível a estímulos diferenciantes.[385-387,219] É, portanto, admissível que os inibidores da síntese de ADN, ao prolongarem a fase S, aumentem esta "janela" e deste modo a sensibilidade a estímulos diferenciantes exógenos ou presentes no meio extracelular (caso de factores diferenciantes endógenos). Este efeito pode ser meramente temporal ou por facilitação da síntese, durante esse período, de algum receptor, enzima ou proteína importante para o processo de diferenciação.

É considerável o potencial terapêutico do sinergismo entre inibidores da síntese de ADN e análogos vitamínicos, dado que se podem obter efeitos maturativos comparáveis com doses 10 a 100 vezes menores, reduzindo assim enormemente a citotoxicidade (e a toxicidade orgânica em geral). Agentes de ambos os grupos têm sido usados isoladamente *in vivo*, tendo produzido respostas sugestivas de diferenciação aumentada.[388-395,376,377] Não são no entanto isentos de toxicidade: o ARA-C (mesmo em baixas doses) agrava frequentemente as citopenias destes doentes, obrigando a internamento hospitalar e cuidados de suporte;[394] o ácido retinoico causa hepatotoxicidade e hiperqueratose[376] e a vitamina D3 hipercalcemia.[396,397] O uso em combinação de drogas dos 2 tipos, em concentrações francamente inferiores às usadas habitualmente na terapêutica indutora de diferenciação, permitirá reduzir sensivelmente a toxicidade sem diminuição do efeito desejado.

Na sequência deste estudo foi feito um ensaio clínico em vários centros (RFH e Royal Victoria Hospital) usando baixas doses (1) de 6-TG (e nalguns casos vincristina, VCR, que se provou também interactuar sinergisticamente com o RET) e RET.[398] Dos 9 doentes sujeitos ao ensaio (6 SMD, 2 LAM pós-SMD e 1 LAM hipoplástica), 7 responderam com aumento de células maduras de pelo menos uma linhagem hemopoiética. É curioso que dos dois doentes que não responderam à terapêutica, um deles foi o único cujas células não responderam *in vitro* (de 7 estudados). Em células de 31 outros doentes estudados (mas não incluídos no ensaio), só as células de um se revelaram insensíveis aos indutores de diferenciação, o que sugere que a completa refractoriedade à indução de diferenciação não é um fenómeno muito frequente.[398]

---

(1) doses mais baixas que em outros ensaios clínicos com indutores de diferenciação (inib. síntese de ADN ou RET).

Vários agentes indutores de diferenciação são capazes de aumentar o grau de diferenciação de células normais e de doentes com Síndrome mielodisplásico e com Leucemia aguda mieloblástica. Combinações dos vários agentes estudados demonstram uma interacção sinergística entre o grupo dos inibidores da síntese de ADN e outros indutores como o ácido retinoico e a N-metilformamida. Este sinergismo indica que os dois grupos de agentes actuam por mecanismos diferentes, mas mutuamente potenciadores. O aumento de duração da fase S provocado pelos inibidores da síntese de ADN vai provavelmente aumentar a sensibilidade da célula a outros estímulos diferenciantes. Este tipo de acção ilustra um possível meio de modulação da probabilidade de diferenciação da célula neoplásica, com ou sem intervenção directa na proliferação celular, embora em última análise a indução de diferenciação terminal acarrete a perda de potencial proliferativo. A verificação de sinergismo de acção diferenciante de vários agentes tem provável aplicação terapêutica e a pesquisa de novas interações (sinergísticas, aditivas ou antagonísticas) é um campo a explorar na investigação dos mecanismos de acção dos mais diversos compostos sobre a diferenciação celular.

V - A ISOFERRITINA ACÍDICA ACELERA A DIFERENCIAÇÃO DE PROGENITORES GRANULOMONOCÍTICOS NORMAIS E ESTE EFEITO É REVERTIDO POR UM ANTICORPO ANTI-FERRITINA ACÍDICA

A ISOFERRITINA BÁSICA NÃO TEM QUALQUER EFEITO APARENTE NA DIFERENCIAÇÃO GRANULOMONOCÍTICA NORMAL

A isoferritina acídica (IFA) foi identificada como sendo responsável pela actividade inibitória (LIA) de células leucémicas (1) sobre progenitores normais.[157] A IFA inibe a proliferação de CFC-GM normais, em fase S e HLA-DR positivas.[157,158] Não inibe no entanto a proliferação de células leucémicas.[154,160]

Esta dualidade de acção sobre progenitores normais e leucémicos, levou a que neste estudo se procurasse investigar o papel da IFA na diferenciação de progenitores GM normais. Para isso foram testadas 3 preparações de IFA.

A IFA aumentava a maturidade dos clones, significativamente na (ou acima da) concentração de 10^{-10}M. Para determinar se este efeito era simplesmente devido a remoção de células em fase S, seleccionando negativamente as células mais maduras e não induzindo, de facto, maturação, trataram-se as células com timidina tritiada de alta actividade específica. Não se notou com este tratamento qualquer variação

(1) A LIA ("leukemia-inhibitory activity") está presente em medula de doentes com leucemia aguda (as mais altas concentrações), LMC e pré-leucemia.[153,154] A entrada em remissão está associada a diminuição ou anulação da LIA.[153,399]

significativa do índice de maturidade. Logo, a acção da IFA não é imitada pelo tratamento com ^{3}H-TdR e deve portanto concluir-se que as duas não actuam da mesma forma. A ^{3}H-TdR mata as células em fase S e a IFA possivelmente força-as a diferenciarem-se, diminuindo assim o seu potencial proliferativo. Tanto o número como a qualidade da progenia derivada de um progenitor são restringidos progressivamente à medida que o progenitor se diferencia[29,30] e a IFA poderá actuar, como influência reguladora, aumentando a velocidade com que estas células se diferenciam.

Em culturas de suspensão, as células medulares tratadas com IFA têm potencialidade diminuida (em número) e restrita (em qualidade), confirmando a observação e a conclusão anteriores, e isto é acompanhado por outros aspectos funcionais (redução de NAT) e citoquímicos (positividade esterásica) de diferenciação. A diminuição em CFU-GM é explicável pela passagem mais rápida para um compartimento mais maduro, com menor potencial proliferativo, e a diminuição de "cluster-forming cells" por diferenciação terminal de células já de si com baixo potencial proliferativo.

O efeito estimulante ou acelerador da diferenciação foi observado com 3 preparações diferentes de IFA, mas era bastante menos pronunciado com a preparação de ferritina de coração. O efeito desta preparação na redução de NAT era mesmo negligenciável (e não significativo) e inconstante no número de CFU-GM, sendo significativo só nalguns pontos-tempo utilizados. Esta diferença de acção entre preparações pode ser levada à conta de diferenças no isolamento e purificação. Diferentes procedimentos dão origem a preparações com diversos *ratio* H/L, grau de glicosilação ou conteúdo de ferro.[157,400]

A ferritina básica não era activa como estimulante da diferenciação, confirmando a ausência de efeito inibidor sobre a proliferação GM observada em anteriores estudos.[157,400]

O efeito da IFA era revertido pelo tratamento desta com um anti-soro anti-ferritina acídica. Esse anti-soro aumentava mesmo por vezes o número de CFU-GM e de células clonogénicas nas culturas de suspensão, em relação ao controle, o que se pode dever a presença de IFA residual no meio de cultura ou à sua produção pelas células (nomeadamente macrófagos) geradas em cultura. Essa IFA residual seria assim inactivada pelo anticorpo.

Não é claro o mecanismo pelo qual a IFA aumenta a diferenciação granulomonocítica normal. Como foi demonstrado anteriormente que a IFA actua em células em fase S,[158,159] é possível que o seu mecanismo de acção seja semelhante ao dos inibidores da síntese de ADN, em que a indução de diferenciação está associada a atraso no trânsito através da fase S. Por outro lado, é possível que a actividade indutora da diferenciação do CSF seja, em parte, devida à IFA, já que é conhecido que o CSF promove a produção desta.[401]

A isoferritina acídica inibe a proliferação de progenitores normais mas não de progenitores leucémicos. Este estudo demonstra que a IFA estimula igualmente a diferenciação de progenitores GM normais e sugere que a inibição da proliferação normal pode ser mediada, pelo menos em parte, por este estímulo diferenciante que iria reduzir o potencial proliferativo das células em questão. A IFA tem sido implicada na regulação em "feed-back" da hemopoiese já que é produzida por células da periferia do sistema (monócitos-macrófagos e linfócitos T). Especula-se se a IFA é a (ou uma das) actividade(s) diferenciante(s) do CSF, pois foi demonstrado que este induz a sua produção. O mecanismo de acção da IFA é desconhecido, mas o facto de actuar sobre células em fase S, inibindo a sua proliferação e estimulando a sua diferenciação, leva à suspeição de que possa actuar de um modo semelhante aos inibidores da síntese de ADN.

VI - A DESFERRIOXAMINA INIBE A PROLIFERAÇÃO E ESTIMULA A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MIELOIDES NORMAIS

A DESFERRIOXAMINA E UM ANTICORPO ANTI-RECEPTOR DA TRANSFERRINA INIBEM A PROLIFERAÇÃO E INDUZEM A DIFERENCIAÇÃO DE LINHAS CELULARES LEUCÉMICAS

O ANTICORPO ANTI-RECEPTOR DA TRANSFERRINA AUMENTA A INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA TRITIADA NAS PRIMEIRAS 24 HORAS

AS CÉLULAS TRATADAS COM ESTES DOIS COMPOSTOS SÃO APARENTEMENTE BLOQUEADAS EM FASE S, COM PROGRESSÃO DEFICIENTE PARA G2-M

O facto de várias proteínas do metabolismo do ferro (IFA, lactoferrina, transferrina) estarem implicadas no controle da hemopoiese é aparentemente relevante e levou à investigação subsequente do papel do ferro como possível mediador desta acção.

A transferrina (TF) é o principal transportador de ferro no organismo. Pelo menos em células imaturas ou da linhagem eritroide, o principal mecanismo de entrada de ferro na célula envolve a ligação da TF diférrica (saturada) ao seu receptor (1),[265] despertando a internalização do complexo TF-Rec. Na vesícula endocitótica, o pH baixo dissocia o Fe do complexo TF-Rec (2) que é então recirculado para o meio extracelular, onde a apoproteína é deslocada do receptor por nova holoproteína (devido à maior afinidade desta).[263,264,402,403]

Vários Atc Mc reconhecendo o Rec TF têm sido descritos.[267-270] Um deles, o Atc 42/6, inibe competitivamente a ligação da TF ao seu receptor, fixando-se a um

(1) A TF saturada tem, a pH fisiológico, muito maior afinidade para o receptor que a apoTF.[263,264]

(2) A pH ácido, a apotransferrina tem alta afinidade para o receptor.[263]

sítio próximo do da TF.[269] Este anticorpo proporciona assim um meio prático (e eficaz) de interferir com o mecanismo normal de entrada de Fe na célula.

A Desferrioxamina (DFX) é uma hidroxilamina produzida pelo Streptomyces pilosus que possibilita a este furtar ao seu meio ambiente o ferro de que necessita.[256] Reage estoiquiometricamente com iões férricos formando um complexo droga-Fe^{3+} (ferrioxamina) altamente estável.[256] É habitualmente usada, pelas suas propriedades de quelante, no tratamento de doenças como a hemocromatose idiopática e a hemosiderose transfusional, caracterizadas por acumulação excessiva de ferro no organismo.[404-412]

A DFX parece quelar Fe de um "pool" intracelular lábil, em formas de baixo peso molecular.[257] O Fe da transferrina e da hemoglobina (e de outras proteínas com núcleos heme) é inacessível à DFX e, embora *in vitro* esta o possa remover da ferritina e da hemosiderina em certas circunstâncias,[256] é duvidoso que tal aconteça *in vivo*.[258] Ao contrário de outros quelantes, a DFX não pode levar ferro para a célula, só o consegue retirar de lá.[258]

No presente estudo, tentou-se estudar o efeito da privação de ferro (por acção da DFX ou do bloqueio do Rec TF) na proliferação e diferenciação de células mieloides normais e leucémicas. A DFX inibia fortemente a proliferação, em culturas semi-sólidas, de progenitores GM normais, a partir da concentração de 10 µM (já se notava um efeito no número total de clones com a concentração de 2 µM). Este bloqueio da proliferação mieloide não parece ser devido a efeito citotóxico directo, por duas ordens de razões: por um lado, se as células fossem incubadas durante um período de tempo até 2 horas com DFX (em concentrações 10x mais altas) e depois cultivadas (após lavagem) na ausência de DFX, não se notava qualquer inibição da capacidade clonogénica dessas células; por outro, se as células fossem cultivadas com 100 µM de DFX e uma quantidade equimolar de cloreto férrico, não havia também inibição significativa, o que sugere que o efeito da DFX sobre a proliferação celular se deve à sua acção quelante do ferro.

Entretanto, e ao contrário do que seria de esperar, as mesmas células medulares cultivadas em suspensão, durante os mesmos 7 dias, expostas à mesma concentração (10^{-5}M) de DFX que abolia completamente a formação de colónias em culturas primárias semi-sólidas, apresentavam só ligeira (e não significativa) diminuição da sua capacidade de formar colónias e clones, quando recultivadas em meio semi-sólido (1). Isto é, essa concentração de DFX impedia a proliferação das células, mas não atingia a sua viabilidade nem significativamente o seu potencial clonogénico. É como se as células fossem mantidas num estado quiescente, mas conservando a sua capacidade de proliferar que se exprime logo que as suas necessidades de ferro sejam satisfeitas. Esta observação sugere que a sobrevida das células progenitoras não necessita de ferro, ou necessita dele em muito menor escala que para a proliferação.

---

(1) Mesmo a incubação em suspensão, durante 7 dias, com 10^{-4}M DFX não abolia completamente a capacidade clonogénica destas células.

As células mieloides normais em suspensão, embora impedidas de proliferar na presença de DFX, aparentavam sofrer um processo de maturação que estará possivelmente ligado à acção daquela droga. As células expostas à DFX exprimiam alguns marcadores de diferenciação (NAT, esterases) em maior grau que as células das culturas controle, embora como se disse não se notasse uma diminuição significativa do potencial proliferativo das mesmas células. Tal diminuição existia no entanto (cerca de 30% menos colónias com 10^{-5} M DFX) e o facto de não ser mais pronunciada pode dever-se ao uso nalgumas experiências de estímulo (PHA-LCM) rico em actividade diferenciante; ou a diferenciação, compensadora, até ao estadio de CFU-GM, de progenitores mais imaturos (como CFU-GEMM).

Ao contrário do observado nas culturas de suspensão de células mieloides normais, a DFX (bem como o Atc anti-Rec TF, 42/6) inibia fortemente a proliferação das linhas celulares leucémicas HL60 e ML2 em suspensão. O efeito do Atc 42/6 e da DFX era não somente citostático, mas também citotóxico, como se podia avaliar pelos restos celulares presentes nas culturas e pela falta de viabilidade (medida pelo Azul Tripano) de células aparentemente íntegras. Este efeito citotóxico era proeminente a partir do 4º-5º dia, nas culturas expostas a DFX, e ao 7º dia nas células cultivadas na presença do Atc 42/6. O facto de se restituir às células a sua capacidade de proliferar (embora em ritmo mais lento que o controle) quando ao fim de 2 dias se lavavam e recultivavam em novo meio (1), parece significar que o efeito é primariamente citostático e só leva a perda de viabilidade celular quando a privação de ferro é demasiado prolongada. Logo aqui surge uma diferença em relação às células normais em que o efeito da DFX (10^{-5}M), mesmo ao fim de 7 dias é predominantemente citostático. Isto pode ter a ver com diferentes graus de cometimento à proliferação, de células leucémicas e normais, ou com o modo como umas e outras respondem ao estímulo proliferativo (2) e controlam o desencadear do processo.

O anticorpo não competitivo B3/25 inibia só marginalmente o crescimento de HL60 (e não tinha qualquer efeito nas outras 2 linhas), o que demonstra que o efeito do Atc 42/6 é genuinamente devido a competição com a TF para o seu receptor, impedindo assim a "internalização" desta e do ferro.

O efeito de 10^{-5}M DFX era sensivelmente semelhante ao efeito produzido pela concentração máxima testada (20 µg/ml) do Atc 42/6, mas ML2 era relativamente mais sensível àquela concentração de DFX do que a esta concentração do anticorpo (ao qual só era moderadamente sensível). A HU (10^{-4}M) produzia nestas duas linhas celulares um efeito paralelo à DFX (10^{-5}M), embora ligeiramente menos marcado que esta em

---

(1) Esta observação está de acordo com observações de outro grupo sobre a acção do Atc 42/6 em relação à proliferação linfocitária.[413]

(2) as linhas celulares têm crescimento autónomo e em muitas delas têm sido identificados factores de crescimento autócrinos.

HL60. A linha eritroleucémica K562 era praticamente insensível quer a 10^{-5}M DFX quer a 10^{-4}M HU e a qualquer das concentrações testadas do Atc 42/6. A diferente sensibilidade de ML2 ao Atc 42/6, por um lado, e à DFX e HU, por outro, pode ser explicada por uma menor densidade de Rec TF (sugerida pela marcação por imunofluorescência), com a possível existência de vias alternativas de entrada de ferro na célula. Foram descritos pequenos peptídeos sideróforos, normalmente existentes em plasma humano[414] ou isolados em mutantes de células transformadas por SV40,[415] que têm a capacidade de estimular a síntese de ADN pela sua propriedade de transportar Fe para o interior da célula através da sua membrana. Outra explicação plausível para esse facto é a possível existência nestas células de receptores da TF antigenicamente diferentes e portanto não reconhecíveis pelo Atc 42/6 (nem pelo B3/25).

Já o comportamento da linha K562 é mais difícil de explicar, tanto mais que as suas células têm uma expressão elevada de Rec TF e que se sabe que elas apreendem Fe pelo mecanismo de endocitose da TF.[264,402] As células de K562 são resistentes não só ao Atc 42/6 como à DFX, e isso pode significar que as suas necessidades de Fe para a proliferação sejam menores. A sua resistência à HU (em concentrações capazes de inibir fortemente as outras 2 linhas celulares) parece indicar que esta linha poderá possuir uma ribonucleotido reductase (RR) mutante, menos sensível à acção desse agente e possivelmente com necessidade diminuida de ferro para o seu funcionamento, já que o mecanismo de inibição da RR tanto pela HU[259] (1) como pela DFX[416,417] parece ser devido à subtracção de ferro necessário à função enzimática; ou alternativamente, as células de K562 podem utilizar em menor proporção a via *de novo* de síntese de ADN, com aumento concomitante da via de recurso ("salvage"), necessitando assim em muito menor grau da RR para formar os nucleotídeos necessários à divisão celular. Porém um facto fica por explicar: a elevada densidade de Rec TF na membrana destas células. Serão estes um estigma ou reminiscência da diferenciação (eritroide) abortada destas células, um passo no sentido do cometimento que não foi acompanhado por outras decisões a nível celular?

Outro dado relativamente paradoxal das acções do Atc 42/6, da DFX e da HU sobre as linhas celulares estudadas é o derivado dos estudos de incorporação de timidina tritiada. Seria de esperar que a acompanhar a inibição da proliferação houvesse diminuição da incorporação de ^{3}H-TdR nas células inibidas. No entanto, observou-se aumento consistente da incorporação precoce de timidina nas células de HL60 tratadas com o Atc 42/6. Estes resultados estão aparentemente em discordância com os obtidos por outro grupo,[413] mas essa divergência pode ser explicada por dois factos: em primeiro lugar, esse grupo mede a incorporação de ^{3}H-TdR só ao fim de 48 horas, altura em que os efeitos do Atc podem ser já predominantemente citotóxicos por privação prolongada de ferro; e em segundo lugar, estuda a proliferação linfocitária em resposta a mitogénios,

(1) A HU é também uma hidroxilamina e possui propriedades (embora pouco estudadas) de quelação de ferro.

a qual poderá ter uma cinética diferente da proliferação de linhas leucémicas mieloides. Também 10 µM de DFX (às 4h.) e 100 µM de HU (às 24h.) causavam um aumento significativo da incorporação de ^{3}H-TdR. Outros grupos referiram um efeito oposto da DFX sobre a incorporação precoce de ^{3}H-TdR: mas uns estudaram timócitos, linfócitos B e uma linha celular T e a inibição só era aparente com concentrações 4 a 6 vezes superiores às usadas no corrente estudo;[418] e outros só encontram inibição em HL60 usando também concentrações 6 vezes maiores.[419] De qualquer modo, no presente estudo a DFX só estimulava a incorporação de ^{3}H-TdR às 4h. de incubação e é interessante notar que no próprio estudo de Lederman et al,[418] experiências com incubação de timócitos durante 4h. com 40 µM de DFX acusavam aumento de incorporação na ordem dos 70%.

Uma possível explicação para o aumento de incorporação de timidina com o Atc 42/6 ou com a DFX é a de que qualquer um deles priva a célula de ferro, um cofactor indispensável à acção da RR, uma enzima que promove a redução de ribonucleosideodifosfatos em deoxiribonucleosideodifosfatos.[420] Estudos anteriores em extractos enzimáticos mostraram inibição marcada da RR pelo tratamento com DFX (embora em concentrações 100 vezes superiores às aqui usadas), com um distúrbio dos "pools" de deoxiribonucleosideotrifosfatos (1) característico da inibição daquela enzima pela HU.[416] A supressão da actividade da RR bloqueia a célula em fase S,[423] mas a relativa ineficiência da via *de novo* de síntese de ADN poderá ser compensada por maior formação "salvage" de nucleotídeos. Isto mesmo é sugerido pelo estudo de Lederman et al em timócitos humanos, em que 20 µM de DFX não afectam significativamente os níveis intracelulares de dTTP, similarmente ao que acontece com 100 µM de HU.[418] O aumento de incorporação de ^{3}H-TdR nestas células poderá assim ser explicado pela acção de dois tipos de influências: uma que, através da compensação operada pela via de recurso ("salvage"), diminuia só ligeiramente (ou mesmo mantinha) a incorporação de timidina por célula; outra que, pelo atraso do processo de síntese de novos nucleotídeos (principalmente dATP), aumentava a proporção de células em fase S, logo elevava o número de células utilizando timidina e concomitantemente o valor absoluto de incorporação por 10^{6} células.

A reforçar esta explicação encontra-se a observação (usando a técnica de citofluorometria de fluxo) feita tanto por nós como por outros grupos[413,418,419] que o tratamento quer com 42/6, quer com DFX, determina um aumento da proporção de células em fase S (predominantemente S precoce).

É claro que um bloqueio inultrapassável em fase S irá resultar em morte celular e, portanto, a manterem-se as condições de inibição, a incorporação de timidina tenderá a baixar após este período inicial.

Finalmente, o problema da aparente diferenciação das células leucémicas quando sujeitas a privação de ferro (por intermédio da DFX ou do Atc 42/6) é um dado novo

(1) Diminuição de dATP e aumento de dTTP, dCTP e dGTP (este menos pronunciado). A HU causa aumento de dTTP e diminuição dos deoxinucleotídeos purínicos.[421,422]

e relevante. O aparecimento de características de maturação parece ser induzido na fase de inibição em que o efeito é predominantemente citostático. Com efeito nota-se que se, ao fim de 2 dias, as células forem recultivadas na ausência do agente, continua a haver proliferação (1), mas o fenótipo (pelo menos de uma proporção considerável de células) é mais maduro que o inicial. Aparentemente as células foram compelidas, durante esses 2 dias, a percorrer um (ou mais) degrau(s) do processo que leva à diferenciação terminal, sem contudo perder a viabilidade e (parte do) seu potencial proliferativo. Como acontecimento probabilístico que parece ser (conforme postulado anteriormente), a indução de diferenciação vai produzir células em variados estadios de maturação. Ao fim de 5 dias em cultura, a percentagem de células maduras no tratamento com 42/6 aumenta, mas começam a fazer-se sentir os efeitos citotóxicos do bloqueio do receptor. Com efeito, quando uma célula é estimulada a entrar em fase S, tem obrigatoriamente de cumprir o ciclo mitótico, sob pena de desarrajo irremediável de funções celulares vitais, conduzindo à morte.[424] A interpretação sugerida pela conjugação dos dados fornecidos pelas experiências de indução de diferenciação em culturas de 7 dias com os das experiências de recultura é que o atraso na fase S, desde que as células sejam autorizadas a de algum modo a finalizar, vai permitir que elas se diferenciem sem que esse evento seja acompanhado de efeitos citotóxicos.

Um outro dado importante é que a HU, um conhecido inibidor da RR, uma enzima chave da síntese *de novo* de ADN, induzia o aparecimento de percentagens semelhantes de células expressando características de maturidade. A percentagem de células NAT positivas obtida com o tratamento com TPA foi maior que com os Atc 42/6, DFX e HU e o TPA também induzia aderência celular ao plástico. De notar que os sinais morfológicos, citoquímicos e funcionais de maturação não são tão marcados em células tratadas com DFX ou 42/6 como nas suas (supostas) congéneres normais nem em células tratadas com TPA ou mesmo HU. Este facto pode ter a ver com a necessidade que as células têm também de ferro para a expressão de um fenótipo maduro. Com efeito, o processo de maturação desloca progressivamente as necessidades de ferro do núcleo (principalmente da RR mas possivelmente também de outras enzimas nucleares) para o citoplasma (peroxidase, catalase, citocromo, etc e hemoglobina nas células eritroides). Em abono desta hipótese, a capacidade de rèduzir o NAT, embora expressa por menos células (devido possivelmente ao crescimento preferencial de células imaturas que sobrelevava o número de células NAT+) era qualitativamente mais intensa nas células recultivadas ao 2º dia na ausência de 42/6 ou DFX. Uma explicação alternativa é que a falta de ferro intracelular não será capaz, só por si, de induzir uma maturação completa e plena, dando lugar a diferenciação defeituosa ou maldiferenciação.

Aliás, a diferenciação leucémica (seja a observada *in vivo* seja a induzida em células leucémicas *in vitro*) é frequentemente anormal também do ponto de vista

(1) A proliferação é, no entanto, mais lenta o que poderá traduzir menor número de células activamente proliferativas.

qualitativo. Esta maldiferenciação pode traduzir-se quer na presença de características morfológicas, antigénicas e funcionais diversas das expressas pelas suas equivalentes normais (ou ausência de outras) quer na presença coincidente de características próprias e específicas de duas (ou mais) linhagens independentes, naquilo que se designa por confusão, infidelidade ou promiscuidade de linhagem. Este conceito resulta da observação de populações com duplo marcador[252,425-433] e mais especificamente da presença ambígua, na mesma célula, de dois marcadores que normalmente caracterizam linhagens diferentes.[434-436] Uma possível interpretação para essa sobreposição de fenótipos é a de que poderá haver um estadio de promiscuidade transitória em que progenitores comuns a mais do que uma linha expressem caracteres normalmente atribuídos à sua progenia.[437] Embora aliciante, esta hipótese não explica o aparecimento de dois marcadores (p.ex., esterase específica e inespecífica) na mesma célula madura.[436] A célula leucémica não tem claramente a mesma "lógica" que a célula normal em termos de diferenciação, por vício intrínseco do próprio processo.

A diferenciação observada em HL60 e ML2 com o Atc 42/6, DFX e HU era predominantemente do tipo monocítico. TPA é, bem como outros forbol ésteres, um conhecido indutor da diferenciação das células de HL60 em monócitos-macrófagos[201,221,272,273] e os inibidores da síntese de ADN favorecem igualmente a diferenciação monocítica sobre a diferenciação granulocítica (observada preferencialmente com o tratamento com DMSO e ácido retinoico).[349]

A linha K562 não revelava qualquer evidência de diferenciação morfológica, citoquímica ou funcional em resposta ao Atc 42/6 ou à DFX ou HU. Não foram utilizados marcadores específicos da linhagem eritroide, mas as células não perdiam o seu aspecto habitual e proliferavam de modo (aproximadamente) normal, o que leva a crer que elas não sejam afectadas pela privação de ferro tanto no que concerne à proliferação como no que respeita à diferenciação celular. Possíveis explicações para esta resistência foram já atrás aventadas, mas é interessante notar que proliferação e diferenciação se encontram novamente ligadas.

É de notar que as células de K562 não se diferenciam habitualmente em resposta a TPA. É no entanto possível induzir a diferenciação desta e de outras linhas eritroleucémicas, humana (HEL) e murina (Friend), por hemina,[438,185] uma protoporfirina resultante da degradação, por oxidação, da hemoglobina e a qual é constituída por um núcleo heme com Fe^{+++} ligado a ião Cl^{-}. A hemina induz a síntese de hemoglobina em K562,[438] principalmente dos tipos Hb X e Bart.[439] Também o ácido butírico pode induzir a síntese de Hb,[440] dos tipos Gower e Portland.[439] Agentes plano-polares (DMSO e HMBA) induzem a diferenciação da linha murina Friend.[208,209,385]

É interessante referir que a HU induz também a produção de Hb fetal em talassémicos e anemias falciformes.[441-443] A ausência no corrente estudo de um "screening" para Hb F, não permite excluir (ou afirmar) que as células malignas (K562) possam tam-

bém responder à HU com o desenvolvimento desse sinal de maturação.

Finalmente, o Atc B3/25 não demonstrou qualquer efeito indutor de diferenciação das linhas HL60 e ML2, sugerindo fortemente que o efeito detectado com o Atc 42/6 era genuinamente ditado pelo impedimento de entrada de ferro na célula.

Um anticorpo que bloqueia a ligação da trasferrina ao seu receptor inibe fortemente a proliferação das linhas leucémicas HL60 e ML2. Este efeito é essencialmente semelhante ao obtido com o quelante Desferrioxamina ou com o inibidor da síntese de ADN Hidroxiureia, o que sugere que a sua acção pode ser mediada por um mecanismo de bloqueio da produção *de novo* de nucleotídeos (Hidroxiureia e Desferrioxamina são inibidores conhecidos da ribonucleotido reductase). Um anticorpo que reconhece o receptor da transferrina mas não inibe a fixação desta não reproduz o efeito. A linha eritroleucémica K562 não é afectada no seu crescimento por nenhum dos três agentes com acção nas outras linhas. O anticorpo bloqueante, a DFX e a HU impedem a progressão através do ciclo celular, levando a acumulação de células em fase S. Este efeito citostático é provavelmente responsável pelo aumento de incorporação precoce de timidina tritiada nas células tratadas, por aumentar o número de células que, com a via *de novo* paralisada, recorrem a timidina exógena para a síntese de dTTP. As células de HL60 e ML2 tratadas com o anticorpo bloqueante, com DFX ou com HU tendem a apresentar sinais morfológicos, citoquímicos e funcionais de maturação. Esses sinais mimetizam, embora menos marcadamente, a diferenciação monocítica obtida pelo tratamento daquelas linhas com o promotor tumoral TPA. A acção continuada dos agentes estudados acarreta a prazo a morte celular, mas as células conservam a sua viabilidade a par das características de maturidade induzida se, após dois dias de exposição aos agentes, forem recultivadas em novo meio.

A DFX inibe também fortemente a proliferação de células mieloides normais e este efeito é revertido pela presença no meio de quantidades equimolares de ferro. Pelo menos em determinadas concentrações, a DFX actua por um mecanismo citostático, já que células cultivadas em suspensão são capazes de proliferar normalmente se recultivadas na ausência do quelante. Também as células normais aparentam sofrer um processo de diferenciação em relação com a privação de ferro causada por aquele agente.

▪ ▪ ▪

Várias proteínas do metabolismo do ferro aparecem, de algum modo, envolvidas na regulação da hemopoiese.

A lactoferrina (LF), uma proteína de 75-80 Kd, com alguma similaridade com a transferrina na sequência de aminoácidos[444] e presente no leite e em grânulos dos polimorfonucleares neutrófilos,[445] inibe a produção de GM-CSF por parte de macrófagos HLA-DR positivos.[146] Este efeito é aparente com concentrações muito baixas (10^{-17}M) e depende do grau de saturação com ferro (só a LF saturada é activa a essa concentração). A LF saturada tem muito maior efeito que a nativa e a apoproteína parece só ter efeito em concentrações $>10^{-6}$M.[162] Segundo outros autores esse efeito seria indirecto, sobre a cooperação entre macrófagos e outras células na produção de CSF.[446] Por outro lado, a LF saturada parece perder actividade a altas concentrações por polimerização da proteína.[447]

A LF tem conhecida acção bacteriostática, privando as bactérias de ferro necessário ao seu crescimento: a LF do leite parece conferir protecção aos recém-nascidos contra gastroenterite por E. coli;[448] e a LF dos neutrófilos é uma das suas armas principais na luta antibacteriana.[147] Após a desintegração dos neutrófilos, a LF é libertada no líquido extracelular, onde pode competir com a transferrina para o ferro. É depois ingerida (fagocitada) por monócitos-macrófagos (que possuem receptores para a LF) sendo o ferro aparentemente incorporado na ferritina.[449-452] Tem sido demonstrada deficiência de lactoferrina em leucemias e síndromes mieloproliferativos[149-152] e por outro lado as células produtoras de CSF são menos sensíveis à LF nesses doentes.[148,152]

A transferrina (TF) saturada parece ter efeito semelhante ao da lactoferrina sobre linfócitos T estimulados por mitogénios.[315] As células alvo da actividade inibitória foram identificadas como sendo OKT4 positivas[284] e expressando igualmente antigénios de classe II do complexo major de histocompatibilidade ("MHC-Class II atg");[453] e uma actividade inibitória semelhante é produzida por células OKT8 positivas.[315]

A LF e a TF saturadas parecem inibir igualmente a produção por monócitos e linfócitos T (T4 ?), respectivamente, de IFA com actividade inibitória.[453] Este facto sugere que as três proteínas constituem um círculo de influências reguladoras da hemopoiese normal.

No que respeita à ferritina, as suas funções não são ainda completamente conhecidas. A ferritina é uma proteína de 450-550 Kd, em forma de concha esférica de centro oco, constituída por 24 subunidades.[281,454] Estas subunidades dividem-se em L (de "liver" ou "light"), de 19000 dalton, e H (de "heart" ou "heavy"), de 21000 dalton; as proporções relativas de cada subunidade condicionam o pI da molécula, sendo que uma molécula com maior número de subunidades H é acídica (pI = 4.8-5.2) e uma em que predominem as subunidades L básica (pI = 5.3-5.8).[282,283,455]

À ferritina têm sido geralmente atribuídas funções de armazenamento de ferro. Uma molécula de ferritina pode albergar, no seu interior, até 4500 átomos de ferro.

Quando o ferro entra na proteína é oxidado de Fe^{2+} para Fe^{3+} [456] e quando é mobilizado é novamente reduzido.[457,458]

A síntese de ferritina é estimulada pela presença de ferro. A célula responde à entrada de Fe produzindo mais cópias da proteína.[459] Isto parece dar-se a um nível translacional ou post-translacional, por desrepressão do mARN[460] (1), embora haja também evidência de transcripção aumentada de mARN de ferritina em resposta ao Fe.[461]

Já há mais de dez anos que se vem progressivamente descobrindo uma relação entre ferritina e neoplasia. Células leucémicas[462] e células mononucleares de doentes com d. de Hodgkin[463] têm síntese aumentada de ferritina. Hazard & Drysdale mostraram que a ferritina produzida pelas células HeLa era do tipo acídico.[464] Doentes com carcinomas da mama e do pâncreas,[465,466] hepatomas[467] e leucemias agudas[468-470] têm ferritinémia aumentada. Não se afigura assim que a ferritina tenha somente funções de armazenamento de Fe (2) e de reserva para a síntese de núcleos heme.

A isoferritina acídica inibe a proliferação de CFU-GM, CFU-GEMM e BFU-E.[157-159] Ao contrário da LF e da TF, não necessita de estar saturada para ter efeito inibitório, actuando mesmo melhor com baixa saturação de Fe.[157] A forma com actividade inibitória parece ser preferencialmente glicosilada,[157] mas isto é ainda controverso.[400] Há também divergência quanto ao grau de inibição da proliferação, afirmando alguns autores não encontrar qualquer inibição.[471] No entanto, os resultados de Broxmeyer et al foram confirmados (total ou parcialmente) por outros grupos.[160,400,472,473] A obtenção ou não de efeito inibitório poderá ser devida a diferenças nas preparações utilizadas ou nos métodos de cultura. Diferenças no procedimento de isolamento e purificação podem seleccionar diferentes moléculas, algumas delas activas e outras não.[400] Diferente actividade de diferentes preparações pode estar dependente do *ratio* H/L, do grau de glicosilação ou da saturação de ferro da proteína. Por outro lado, os progenitores sensíveis a inibição pela IFA parecem constituir uma subpopulação de CFU-GM Ia+, a qual necessita de dois sinais (CSF e lipopolissacárido) para proliferar.[473] Progenitores mieloides tendem a perder os antigénios Ia e a sensibilidade à IFA ao fim de 5-6 horas em suspensão, mas recuperam ambos quando estimulados por CSF.[158]

A IFA tem igualmente acção inibidora sobre a função linfocitária,[474-477] nomeadamente inibindo a resposta linfocitária a mitogénios (PHA, Con-A) e a reacção linfocitária mista.[476] Suprime também a mielopoiese de "rebound" em ratinhos tratados com Ciclofosfamida.[453]

Dada a inexistência de um sistema que promova selectivamente a proliferação (sem diferenciação) de progenitores normais, é difícil saber se o equivalente normal

---

(1) por libertação e estabilização das subunidades formadas.

(2) a ferritina actua como "tampão" que impede a acumulação de Fe livre num "pool" intracelular lábil, potencialmente "damaging" (a presença de Fe não ligado pode causar geração de radicais livres de oxigénio).[257,258]

da célula leucémica produz IFA (e a que ritmo) ou se a produção desta é propriedade dos progenitores leucémicos. Sabe-se no entanto que células leucémicas induzidas a diferenciarem-se têm maior conteúdo de ferritina do que células não induzidas.[478]

Além de ser produzida por células leucémicas (de doentes e linhas celulares leucémicas), a IFA é também produzida por monócitos-macrófagos[161] e por linfócitos T.[479,480] Este facto torna-a numa molécula-candidata para a regulação de "feed-back" da hemopoiese.

A ferritina acídica difere da básica na velocidade, mais alta, com que se liga e desliga do ferro, aparecendo principalmente em lugares onde é necessário rápido "turnover".[455] Por outro lado, tem maior avidez para o Fe e é portanto capaz de quelar maiores quantidades.[455] É portanto de admitir que a ferritina básica seja um "depósito" mais inerte de ferro, enquanto que a ferritina acídica possa estar envolvida noutras funções.

A hipótese da IFA actuar a outros níveis, como o da regulação da proliferação e diferenciação celulares, é sem dúvida aliciante e parece ser confirmada por toda a evidência experimental aqui documentada. Mas a forma pela qual a IFA efectua esta regulação é ainda desconhecida, embora seja possível que actue quer por intermédio da sua componente proteica quer através da sua propriedade de quelar ferro. Já foram identificados receptores para a ferritina em células de diversas linhagens e tecidos,[481-483,474] mas não foram ainda demonstrados em progenitores mieloides devido a dificuldade óbvia na sua purificação.

Um ponto importante resta por explicar: é o facto de progenitores normais e leucémicos terem diferentes sensibilidades à IFA. Por ausência de ligação da ferritina à célula leucémica? Por incorrecto processamento do sinal ou ausência de resposta a este? Por deficiente interacção da proteína com o ferro nas células leucémicas?

Para o esclarecimento desta questão pode ser importante a observação de que o interferon restaura parcialmente na linha celular U-937 a sensibilidade à actividade inibidora da IFA, o que pode estar relacionado com a indução concomitante de antigénios Ia.[453]

A investigação da origem da divergência de sensibilidades entre células normais e leucémicas à acção da IFA pode levar a uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na génese e manutenção do processo leucémico.

É sugestivo o facto de várias proteínas do metabolismo do ferro (1) terem uma acção reguladora da hemopoiese, o que induz a pensar que o ferro possa de algum modo estar envolvido neste processo.

---

(1) Também a hemina (protoporfirina IX cloreto férrico), a forma férrica, oxidada, de heme não ligado à globina, tem acção estimulante da formação de colónias por CFU-GEMM e BFU-E humanas e por progenitores normais e leucémicos murinos.[484-487] A hemina induz a diferenciação de células das linhas eritroleucémicas humanas K562 e HEL e murina Friend.[438,439,488]

O ferro é um mineral ubiquitário, necessário para muitas funções celulares. Uma variedade de proteínas com núcleo heme está presente em células maduras funcionais. Muitas reacções oxi-redox ocorrendo no organismo utilizam o ferro como dador-aceitador de electrões.

A proliferação celular está também intimamente dependente do ferro e das proteínas que intervêm no seu metabolismo. Transferrina e ferro são componentes essenciais de meios de cultura para o crescimento *in vitro* de muitas estirpes celulares.[165,285-289] Além das células da linhagem eritroide que são, como é óbvio, as maiores utilizadoras de ferro no organismo para fazer face às necessidades decorrentes da síntese de hemoglobina,[489] precursores imaturos de várias linhagens expressam receptores da transferrina em alta densidade,[40] sugerindo uma necessidade que não é explicável pela sua diminuta produção de núcleos heme. Também uma larga série de carcinomas, sarcomas, linfomas e tumores embrionários estudados com um atc anti-Rec TF[490] e linhas celulares leucémicas[267,268,491,492] têm expressão avultada deste antigénio de membrana. Outras células activamente proliferativas expressam Rec TF quando estimuladas[267,268,413,493-495] e um atc bloqueante do Rec TF que compete com a própria TF saturada para a fixação ao Rec e subsequente "internalização" (impedindo assim a incorporação de Fe na célula por este mecanismo)[269] inibe a proliferação de linfócitos T,[413,493] B[495] e de linhas celulares leucémicas mieloides (como demonstrado neste estudo). Em linfócitos T quiescentes, a expressão de Rec TF é estimulada pela exposição a IL2 (interleuquina 2 ou "T-cell growth factor", TCGF) e a inibição competitiva dos receptores de IL2 (por atc anti-Tac) não produz efeitos sobre a síntese de ADN se efectuada após a indução dos Rec TF o que claramente indica que este é o (ou um dos) mecanismo(s) pelo qual a IL2 induz a proliferação linfocitária.[493] Por outro lado, existem pequenos peptídeos sideróforos que estimulam a síntese de ADN pela sua acção transportadora de Fe através da membrana.[414,415]

Esta necessidade de Fe para a proliferação celular deve-se provavelmente à dependência evidenciada pela enzima nuclear ribonucleotido reductase (RR), para cuja actividade se requer ferro.[496] A RR é uma enzima chave na síntese de ADN, ao catalizar a redução de ribonucleosideodifosfatos em deoxiribonucleosideodifosfatos.[420,497-499] Em células de mamíferos (tal como em células procarióticas), a enzima é constituída por 2 dímeros, M1 e M2. A subunidade M1 (peso molecular = 170000 dalton), composta de 2 polipeptídeos idênticos, contem os sítios de ligação para a regulação alostérica pelos efectores deoxiribonucleosideotrifosfatos.[500,501] A proteína M2 é também um dímero de c 110000 dalton que contem no centro 2 átomos de ferro férrico inorgânico (não-heme) e um radical livre de tirosina, responsável pela actividade redutora da enzima.[502,503] A contínua geração do radical livre requer a presença constante de oxigénio e ferro.[504] Esta subunidade é o alvo da inibição provocada pela hidroxiureia a qual destroi o radical de tirosina.[505] A RR é inibida pela desferrioxamina[416] e outros quelantes

do ferro[417,506] e por deficiência de ferro.[416] Esta acção parece ser causada pela redução, pelo quelante, do ferro para a forma ferrosa, a qual reage com oxigénio molecular num processo redox que leva à destruição do radical de tirosina.[506]

Em células neoplásicas, vários destes mecanismos podem estar alterados. Em relação às proteínas do metabolismo do ferro, e além das já discutidas acção da isoferritina acídica como actividade inibidora leucémica e da proeminente expressão de Rec TF, é de notar que a análise nucleotídica de um gene transformador detectado por transfecção de ADN de um linfoma de células B em galinhas (mas não relacionado com retrovírus oncogénicos) mostra que ele codifica para uma proteína com homologia parcial para o terminal aminado da transferrina.[507] Células tumorais parecem ter a capacidade de segregar peptídeos transportadores de ferro para fazer face às suas necessidades.[415] A TF foi também implicada como sendo um factor de crescimento fetal, estimulando a proliferação celular, durante a embriogénese.[508] Há, por outro lado, uma relação estrutural e funcional entre a TF e o atg p97 (presente em melanomas humanos).[509] De realçar ainda que o receptor da TF parece ser a estrutura-alvo da actividade antitumoral das "NK cells",[262] facto que reforça o conceito do ferro como "pivot" da vigilância imunológica, anteriormente sugerido.[510]

Por seu lado, a RR está alterada em diversos tumores. Hepatomas de crescimento rápido têm actividade específica da RR muito aumentada - cerca de 200 vezes maior que em hepatomas de crescimento lento - enquanto que, nas mesmas circunstâncias, a timidilato sintetase e a timidino quinase só exibem aumentos de 15-20 vezes e 40 vezes respectivamente.[511] Ribonucleotido reductases mutantes têm sido isoladas em clones mutantes de linhas celulares T,[512-515] de linhas CHO ("chinese hamster ovary")[516,517] e de fibroblastos murinos,[518] entre outras. Foi sugerido que uma RR mutante, caracterizada por ausência de necessidades de Mg^{2+} e resistência à inibição por dTTP e dATP e presente em células infectadas por herpes simplex virus-2 (HSV-2),[519] estaria implicada na transformação proliferativa sofrida por essas células.[520] Algumas RR mutantes são resistentes à HU, evidenciando actividade de M2 30 vezes aumentada com actividade de M1 normal.[518,503] Também foram observadas alterações da RR em associação com a replicação do vírus de Epstein-Barr.[521]

▪ ▪ ▪

HIPÓTESE

As formas de vida adquiriram, ao longo do Tempo, mecanismos "inteligentes" de sobrevivência com uma lógica interna inultrapassável: o máximo proveito com o mínimo custo, na procura incessante do meio tecnicamente mais perfeito e menos vulnerável. A tendência egocêntrica de cada célula foi, no entanto, limitada pela sua associação em organismos simbióticos que se assumiram e desenvolveram como formas de mútua cooperação. Viver em sociedade impõe regras e a célula passou a contar, além da adversidade do ambiente, com a influência determinante das suas co-habitantes.

Uma das "leis" que nasceram com a multicelularidade foi a da limitação da capacidade geracional de cada célula. Concomitantemente, outras "leis" surgiram que conferiam a todas as células um papel no organismo, uma especialização. Não foi sem rebeldia ou turbulência que este processo se desenvolveu. Esta turbulência e rebeldia terão sido possivelmente responsáveis por parte da progressão evolutiva das formas de vida, ao originar mutações que mais não foram que inflexões bruscas ou "saltos" genéticos para formas organizativas superiores e mais complexas. E mesmo com uma crescente repressão estrutural, rebeldia e turbulência sobrevêm a toda a hora na sua manifestação mais caótica e inequívoca: a neoformação.

A sedução pueril de encontrar uma explicação universal que sirva a todas as regras da Vida tem estado sempre subjacente ao percurso do Homem. Esta sedução não se coaduna com a crescente demonstração da complexidade dos processos biológicos. Entre estes encontra-se a regulação da proliferação e diferenciação celulares, a qual tem merecido a atenção e o trabalho de milhares de cientistas. Uma grande variedade de moléculas exógenas e de mecanismos internos intervem nestes processos celulares. **É, no entanto, lícito pensar que as decisões finais sejam tomadas por modulação de elementos ou condições simples e ubiquitários.** O ferro é um candidato plausível, pois está no fim de uma cascata de reacções de moléculas reguladoras intermédias e pode, como se viu, afectar o metabolismo nuclear. Isto não exclui, todavia, outros sistemas reguladores dos quais o mais proeminente e mais bem estudado é o do cálcio (Ca^{++} - cAMP - prostaglandinas;[134-137,522] Ca^{++} - calmodulina (fosfodiesterase, adenilciclase, guanilciclase) - cAMP;[523,524] Ca^{++} - proteína quinase C - inositol fosfolipídeos;[525] Ca^{++} - despolimerização dos microtúbulos - iniciação da proliferação;[526-528] Ca^{++} - poliaminas[529]). O Ca^{++} é reconhecidamente mitogénico[530-532] e os nucleotídeos cíclicos actuam na proliferação e diferenciação celulares.[134,424,533] Outro possível regulador elementar é o pH.[534]

O presente estudo sugere que a regulação da proliferação e diferenciação celulares no sistema mieloide pode ser pelo menos parcialmente mediada pelo ferro. A observação de que a privação de Fe (causada pela DFX e pelo Atc anti-Rec TF) afecta a proliferação e estimula a diferenciação celular mieloide, parece confirmá-lo. Um efeito citostático, com "congelamento" das células em fase S, foi postulado. É curioso que este efeito é semelhante ao obtido com a HU, um conhecido inibidor da RR. Se a acção é demasiado prolongada, o efeito torna-se citotóxico e leva a perda de viabilidade das células. Mas se se permitir às células dispor novamente de ferro e concluir o ciclo celular, elas diferenciam-se sem que tal acarrete a sua morte, a não ser por maturação terminal e senescência.

Um outro grupo, estudando o efeito do Atc 42/6 na proliferação blástica B, em trabalho contemporâneo deste, observou que o Atc inibia a proliferação mas não inibia a secreção de imunoglobulina por parte das células B estimuladas por mitogénio.[495] Esta observação, embora não interpretada pelos seus autores como tal, é a documentação da acção diferenciante do Atc anti-Rec TF, noutra linhagem celular. O processo de síntese e expressão do idiotipo não requer ferro e é assim um sinal de maturação talvez mais proeminente do que os detectados na diferenciação mieloide.

Outro dado a favor da eventual intervenção do ferro na regulação da proliferação e da diferenciação celulares é a observada redução do número de Rec TF na membrana de células leucémicas por acção de forbol ésteres (TPA e PMA, 4 β-forbol-12-miristato-13-acetato)[535,536] reconhecidos indutores da diferenciação de certas linhas celulares leucémicas e inibidores da sua proliferação.[201,221] Este facto sugere que pelo menos um dos mecanismos pelos quais o TPA inibe a proliferação e induz diferenciação é provocando a redução de Rec TF disponíveis e assim obstando à "internalização" de ferro. A acção dos forbol ésteres parece ser mediada pela proteína quinase C[537] que é um receptor-candidato para os forbol ésteres[359] e que actuaria fosforilando a glicoproteína (Rec TF) em resíduos de serina e promovendo a sua "internalização" sem ocupação por TF ou outro "ligand".[535,536] Num dos estudos a "internalização" acarretava a diminuição de Fe incorporado intracelularmente,[536] mas no outro isso não se observava.[535] É interessante referir que neste último estudo as células estudadas eram de K562.

A inibição da RR vai, como se viu, bloquear as células em fase S. Isto atrasa a proliferação, mas quais são os mecanismos que vão induzir a diferenciação? As células inibidas dispõem da capacidade para manter adequada síntese de ARN e proteínas (como se pode ver pela incorporação de ^{3}H-uridina e ^{14}C-leucina, ^{14}C-valina, ^{14}C-treonina).[418] Isso quer dizer que a inibição da RR vai, pelo menos durante certo intervalo de tempo, permitir a formação de novas proteínas. E é lícito pensar que com a síntese de ADN bloqueada, estas proteínas possam, de algum modo, condicionar passos irreversíveis da evolução para a maturidade. Por outro lado, as células em fase S parecem ser particularmente sensíveis à acção de moléculas com actividade diferenciante, como foi demons-

trado neste estudo e em outros.[219,385,386] Assim, uma outra possibilidade é a de que o alongamento da fase S possa tornar estas células mais permeáveis à acção de moléculas diferenciantes exógenas, existentes no meio de cultura (e logicamente no ambiente extracelular fisiológico) como também foi evidenciado neste estudo.

O candidato principal a efector desta regulação é a isoferritina acídica. A inibição da "internalização" de Fe pelo mecanismo de endocitose do complexo TF-Rec (embora seja um outro candidato, não de todo de excluir (1)) acarreta geralmente inibição da proliferação e perda da viabilidade celular (mesmo quando estimulada por TPA, como se pode ver pelos resultados deste estudo), por não permitir a entrada de Fe na célula. Ora o próprio processo de diferenciação vai requerer ferro. A IFA actuaria possivelmente a nível intracelular, num mecanismo mais "suave" e fisiológico. A IFA promove a diferenciação de progenitores mieloides normais, como se viu, e actua sobre células em fase S.[158] A síntese de ferritina é estimulada pela presença de ferro livre na célula[459,460] e a proteína assim produzida poderá actuar competindo para o Fe da RR (embora isto ainda não tenha sido bioquimicamente demonstrado) ou em passagem para (ou de) esta. Ou alternativamente, ferritina exógena pode entrar na célula e desempenhar essas funções. Receptores para a ferritina foram já identificados na membrana de células de várias estirpes (precursores eritroides,[481] reticulócitos,[483] células hepáticas[482]), embora não tenham ainda sido pesquisados em células leucémicas ou precursores mieloides (nestes por evidentes dificuldades de purificação). O deslocamento progressivo das necessidades de Fe do núcleo para o citoplasma durante a maturação, sugere que pode haver um mediador (ou "ponte") que proceda ao aproveitamento do Fe nuclear. Não é de esquecer que a ferritina tem a capacidade de (re)oxidar Fe ferroso quando o incorpora,[456] embora o liberte novamente no estado ferroso por acção redutora de flavinas reduzidas.[457] Desconhece-se se a ferritina pode captar Fe férrico pois este é insolúvel no citosol. O ferro ferroso, em forma não-ligada, é um potente agente oxidante[538] e pode causar dano às células por toxicidade por radicais livres e peroxidação lipídica, como acontece na sobrecarga de ferro.[539,540] Por outro lado, a ferritina constitui uma reserva de ferro para a síntese de proteínas citoplasmáticas, nomeadamente de núcleos heme. A IFA actuaria assim em células mieloides normais, modulando a quantidade de Fe disponível para a RR e por outro lado suplementando-o a proteínas que vão sendo produzidas durante a diferenciação, num processo dinâmico. É sugestivo o facto de a IFA ser produzida por células da periferia do sistema hemopoiético, como macrófagos[161] e linfócitos T[479,480] e poder assim ser considerada um regulador de "feed-back" da hemopoiese. Igualmente significativa é a interacção do metabolismo da IFA com o de outras proteínas siderofílicas, como a lactoferrina e a transferrina. Os monócitos-macrófagos possuem receptores para a LF[449-452] e a incorporação de Fe ligado à LF (saturada) irá provavel-

---

(1) aliás, este parece ser o mecanismo pelo qual as "NK cells" exercem o seu efeito inibidor das células tumorais.[262]

mente induzir a síntese de ferritina. Desconhece-se se a proteína assim formada tem funções de armazenamento de Fe ou também actividade inibitória (e diferenciante) sobre progenitores mieloides (1). O mesmo pode acontecer ao Fe incorporado via TF, em outras células. É também de considerar o facto de a síntese de IFA ser estimulada pela interacção de M-CSF com células-alvo da linha monocítica.[401]

Se esta hipótese de regulação da proliferação e diferenciação de células mieloides normais é sedutora, fica por explicar a ausência de efeito inibitório da IFA sobre células leucémicas (as quais no entanto a produzem). Aqui poderá residir uma das razões pelas quais estas células fogem ao controle normal do crescimento e diferenciação. A resistência das células leucémicas à IFA poderá ter origem em um ou mais de vários mecanismos: 1) ausência de sensibilidade à ferritina, por falta de (ou defeituosos) receptores de membrana para a proteína ou por outras razões que diminuam a possibilidade de interacção da proteína com o Fe intracelular. É de notar que as células leucémicas produzem IFA em grande quantidade o que sugere que não a conservam intracelularmente.[157] Esta IFA ("leukemia inhibitory activity") não é saturada,[157] o que parece indicar que não cumpriu (pelo menos totalmente) as suas funções de armazenamento de ferro; 2) Diminuição das necessidades de Fe de uma RR mutante em células leucémicas. No presente estudo, isso não acontecia em 2 das 3 linhas celulares testadas. Na literatura, nada tem sido referido quanto a RR mutantes requerendo menos Fe, mas é interessante notar que células resistentes à HU evidenciam um aumento de 20 vezes de conteúdo do radical livre de tirosina com um aumento de apenas 3 vezes na quantidade de proteína M2;[504] 3) Possível aumento de incorporação de Fe nas células neoplásicas via Rec TF ou por outros mecanismos como a produção por certas linhas celulares de peptídeos sideróforos cuja missão seria a de "scavenger" de Fe extracelular para necessidades aumentadas da célula.

(1) Evidência preliminar aponta para uma diminuição da libertação de actividade inibitória por parte das células tratadas com LF.[401,453]

POSFÁCIO

A hemopoiese, com um alto ritmo diário de produção de células, é mantida dentro dos estreitos limites fisiológicos por um complexo sistema de regulação. Este sistema inclui diversos factores de crescimento os quais estimulam "stem cells" em vários estadios a proliferar, proliferação essa que é acompanhada por um processo maturativo que conduz à diferenciação terminal. Em células normais, proliferação e diferenciação estão interligadas de um modo tão íntimo que a estimulação por um factor de crescimento leva *in vitro* à formação de colónias de células maduras. É difícil discernir se a actividade diferenciante desenvolvida por um factor de crescimento lhe é inerente ou se de qualquer outra forma o acompanha ou lhe é consecutiva, mas a resposta dos progenitores normais a esta actividade diferenciante apresenta características idênticas às da resposta proliferativa. Ambas podem ser linearizadas através de transformações logarítmicas.

É no entanto possível variar, em células normais, o equilíbrio entre proliferação e diferenciação de forma a modificar a amplificação do sistema e consequentemente o número de células maduras formadas. Predomínio da proliferação sobre a diferenciação celular tende a formar uma progenia mais ampla embora o processo de maturação seja mais longo; uma diferenciação acelerada privilegiará uma maior rapidez de produção de células funcionais em detrimento da quantidade destas. Experimentalmente, isto foi obtido através da manipulação de subpopulações linfocitárias T, observando-se que uma população T3+,MBG6+,OKT8/RFT8+ estimula a diferenciação granulomonocítica, tendo como consequência a diminuição da amplificação do sistema; a eliminação desta subpopulação tem o efeito inverso. É lícito pensar que o organismo tenha a capacidade de, através de um "feed-back" regulador, aumentar ou limitar o número de células diariamente formadas. Aqui se postula que esta regulação possa ter como efectoras células normalmente envolvidas na resposta imune, nomeadamente as células citotóxicas/supressoras. Essas células poderão actuar por interacção célula-célula, mas parece claro dos resultados deste estudo que pelo menos parte desta acção é mediada por factores solúveis.

Várias moléculas inibidoras da hemopoiese humana têm sido descritas. Entre elas encontra-se a isoferritina acídica. Os resultados do presente estudo sugerem que esta proteína poderá actuar negativamente sobre a proliferação celular através de um estímulo para a diferenciação de progenitores granulomonocíticos, fazendo-os passar mais rapidamente a estadios com progressivamente menor capacidade proliferativa. A isoferritina acídica é assim, juntamente com outras proteínas do metabolismo do ferro, um candidato a efector da regulação do mecanismo de amplificação do sistema. Os progenitores responderiam, com maleabilidade funcional, a sinais da sua periferia.

Igualmente se postula que a opção proliferação/diferenciação é regulada por uma probabilidade de proliferação e uma probabilidade de diferenciação, inerentes à célula, mas não obstante sujeitas a modificação por influência de factores ambienciais. Do jogo entre a probabilidade interna (fixa) e a probabilidade externa (variável) resultará estocasticamente a decisão celular. Na célula leucémica haveria alteração radical da probabilidade intracelular de diferenciação (por defeito estrutural genético e vício inerente de processos enzimáticos), mas mesmo assim susceptível de modulação pelo meio extracelular como se verificou em várias experiências. Este modelo fornece uma explicação óbvia para a frequente heterogeneidade fenotípica da população leucémica. Além do natural estímulo à diferenciação presente no meio extracelular, é ainda possível "forçar" a maturação da célula leucémica recorrendo a uma variedade de agentes físicos e químicos. Essa acção adicional, conferindo flexibilidade insuspeita à aparentemente rígida célula neoplásica, dá-se através de diferentes mecanismos, alguns deles concorrentes ou sinergísticos. O sinergismo poderá dar-se por facilitação, por certos agentes, de eventos susceptíveis de serem desencadeados por outros agentes ou por permeação por uns à acção de outros. Uma hipótese explorada, na indução de maturação de células leucémicas, foi a do alongamento da fase S do ciclo celular por acção de agentes inibidores da síntese de ADN ocasionando, por mero efeito temporal ou por outro desconhecido processo bioquímico, um aumento da sensibilidade da célula a outros agentes indutores.

O ferro poderá ter um papel central neste mecanismo. A privação de ferro, causada experimentalmente pela desferrioxamina ou por um anticorpo que bloqueia a ligação da transferrina ao seu receptor, simula os efeitos diferenciantes da hidroxiureia e em menor escala do promotor tumoral, tetradecanoilforbolacetato. O ferro é essencial ao funcionamento da enzima nuclear ribonucleotido reductase e a sua subtração a essa enzima paralisa a síntese *de novo* de nucleotídeos, aumentando a duração da fase S e mimetizando os efeitos de outros agentes bloqueantes da replicação de ADN. A inibição da ribonucleotido reductase seria assim a acção facilitadora que permitiria a moléculas diferenciantes presentes no meio extracelular actuar favoravelmente à expressão de características morfológicas e funcionais de maturação. Aqui se constroi a hipótese de que a isoferritina acídica seja o agente com capacidade moduladora fisiológica do ferro intracelular, regulando subtilmente a decisão proliferação/diferenciação.

O facto de o bloqueio da proliferação celular, por agentes citostáticos, gerar diferenciação é irrelevante para a determinação do defeito funcional primário da célula leucémica, isto é, esse facto só por si não significa que a leucemia seja uma doença primariamente proliferativa. A questão nuclear entre proliferação e diferenciação não é a de se saber qual é que condiciona ou sobreleva a outra, no jeito da história do ovo ou da galinha. Tudo indica que os dois processos estão intimamente interligados e que modulações ínfimas das respectivas intensidades levem a predominância de um deles sobre o outro.

O que está verdadeiramente em causa é que o aparecimento, tanto na evolução filogenética como na ontogenética, da diferenciação como evento, vai condicionar irremediavelmente o estatuto proliferativo das células. É contra a perda desse "status" que as células leucémicas se "revoltam", mesmo contra a lógica natural que fez dos seres multicelulares organismos mais aptos que os unicelulares à sobrevivência e adequação ao meio.

SUMMARY

Blood has a high cellular turnover. The short life span of polymorphonuclear phagocytes, monocytes and platelets and the large number of circulating red blood cells imply a massive and steady generation of mature cells. Mature functional cells derive (or stem) from primitive, early precursors after several division cycles and maturation changes. These precursors are called haemopoietic stem cells or pluripotent progenitors. A stem cell is defined by its pluripotentiality, i.e., the capacity to give rise to the different haemopoietic lineages, and an extensive capacity to self-renew, i.e., to divide in similar primitive cells. Self-renewal and differentiation coexist in dynamic equilibrium, in order to replenish the blood with mature cells without depletion of the progenitor pool. As a stem cell differentiates along the pathway, its potentiality is reduced both in number of cells and lineages it is able to give rise. Committed (or restricted) progenitors apparently lack the capacity to self-renew indefinitely.

Several culture systems for haemopoietic progenitors have been described: clonal growth is supported by a semi-solid medium, serum factors and basic ingredients; and every stage of a progenitor' differentiation responds to an appropriate growth stimulus. Haemopoietic growth factors are hormone-like peptides known to trigger target cells into cycle and to induce cell differentiation into one or more lineages.

In this study, a technique for culture of committed granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) was used to look at the behaviour of normal and acute myeloid leukaemia cells exposed to different concentrations of the physiological stimulator of granulopoiesis, GM-CSA (granulocyte macrophage-colony stimulating activity). GM-CSA induced normal cells' differentiation in a dose-dependent manner. Increase in differentiation with CSA concentration was monotonic and a linear relationship between the two was obtained by means of a simple logarythmic transformation of the maturity index used in the experiments. Leukaemic cells also differentiated in response to CSA but the extent of maturation achieved in culture varied from case to case. Yet, differentiation obtained by leukaemic cells never reached the level achieved by reference cells, in the same culture conditions. The *ratio test slope: reference slope* was expressed as a differentiation-sensitivity factor (D-SF) which measures the ability of cells from individual patients to differentiate in response to CSA increments. Two tested leukaemic bone marrows had an endogenous differentiation-inducing activity (E-DIA) with the same characteristics of exogenously supplied DIA. Endogenous DIA is probably responsible for the extent of differentiation of leukaemic cells *in vivo*.

These observations apparently rule out the existence of a rigid and predetermined

differentiation block. The leukaemic population is heteromorphic with cells in various maturation stages. Furthermore leukaemic cells are able to mature in response to normal differentiation factors. These conclusions favour the hypothesis of a probabilistic model for the proliferation/differentiation decision. The abnormal maturation of leukaemic cells would correspond to a diminished probability of differentiation rather than to a physical constraint. This altered probability could be due to defective recognition or processing of the differentiation signal or to some other diseased intracellular machinery, e.g. gene expression. It is also postulated that the final probabilitity of differentiation should be the resultant of internal (constant) and external (variable) probabilities. The cell option would not be purely stochastic but somehow influenced by environmental factors.

Leukaemic cells do not proliferate faster than their normal counterparts but they differentiate less and so keep on proliferating. An altered probability of differentiation should then account for the unlimited proliferation of leukaemic cells.

Following this model, the relative predominance of proliferation or differentiation in normal cells would be ultimately ruled by the concentration of proliferation or differentiation stimuli in the vicinity of the cell. One was able to document that different T cell subsets have different effects on normal CFU-GM differentiation. Selective depletion of an OKT3/MBG6 positive population from CSA-producing feeder layers delayed maturity of myeloid progenitors in culture. The effect was reversed when an OKT8 positive subpopulation was added back. The treatment with the monoclonal antibody RFT8 and complement reproduced the maturation delay effect. The delay in normal differentiation resulted ultimately in the formation of larger clones, meaning that the cells had remained longer with proliferative capacity. This is in agreement with the previously postulated for leukaemic cells.

Differentiation of normal and leukaemic cells may be further induced by a number of physical and chemical agents. As cells are constrained to terminal differentiation they exhibit morphologic, cytochemical, antigenic and functional features of maturity and gradually lose proliferative potential. The latter relates to the number of divisions that a progenitor is able to undergo until it becomes a mature undividing cell. A synergistic interaction between DNA synthesis inhibitors and other agents on the promotion of cell differentiation was found. The therapeutic potencial of synergistic combinations of differentiation-inducing agents is currently being exploited.

Leukaemic cells also secrete an inhibitory activity of normal GM progenitors (LIA). LIA was identified as acidic isoferritin (AIF) and is devoid of any effect on leukaemic progenitors. AIF is also produced by mature cells of the monocytic lineage and has been suggested as a feed-back regulator of haemopoiesis. It was found that AIF enhances differentiation of GM progenitors in semi-solid and suspension cultures. This effect was apparent with three different preparations of acidic isoferritin and

was reversed by an anti-heart ferritin antibody. The differentiation-enhancing effect of AIF was not mimicked by treatment of bone marrow cells with high specific activity tritiated thymidine, indicating that it is not due too a mere removal of actively proliferating cells. No effect was seen with basic isoferritin. These observations suggest that the reported inhibitory effect of AIF on the proliferation of normal granulocyte-macrophage progenitors might be related to an increased rate of differentiation, thus limiting their proliferative potencial.

Other iron-binders (lactoferrin, transferrin) have a similar regulatory activity in granulopoiesis. The possible involvement of iron as a common mediator of the action of the three proteins prompted a study of the role of iron in cell growth and differentiation. Two types of approach were used: to deprive the cells of iron using the chelator Desferrioxamine (DFX); and to prevent cellular uptake of iron by blocking transferrin internalization. Transferrin ferries iron from mononuclear phagocytic deposits to iron-requiring cells. Diferric (saturated) transferrin binds to a double chain transmembrane glycoprotein, the transferrin receptor. Ligand binding triggers receptor internalization with subsequent delivery of iron into the cell. A monoclonal antibody (42/6 Ab) binds to a similar site in the receptor, inhibiting competitively transferrin binding.

Desferrioxamine showed a differentiation-enhancing effect on GM progenitors and stimulated the appearance of esterase positivity and nitrobluetetrazolium reduction in leukaemic cell lines. The 42/6 Ab had a similar inducing activity in leukaemic cell lines (HL60 and ML2). DFX (10^{-5}M) markedly inhibited proliferation of normal cells and cell lines and the 42/6 Ab had variable effects, inhibiting strongly HL60, moderately ML2 and only marginally K562, at the maximal concentration used (20 µg/ml). Conversely, tritiated thymidine uptake was consistently increased at 4 and 24 hours with the 42/6 Ab treatment. The effect on cell growth and differentiation was essentially the same as that observed with Hydroxyurea, a DNA-synthesis inhibitor. All three agents apparently block cells in S phase delaying entry into mitosis.

Hydroxyurea and desferrioxamine inhibit ribonucleotide reductase (RR), a central enzyme in DNA synthesis. RR catalyses reduction of *de novo* ribonucleoside diphosphates and iron is required for the continual generation of a tyrosine free radical necessary for enzyme activity. An increase in the length of S-phase might render the cell more susceptible to differentiation stimuli; alternatively, RNA synthesis proceeding in the absence of DNA replication might lead to expression of some gene(s) essential for differentiation.

Therefore, availability of intracellular iron may condition proliferation and differentiation. It is conceptually possible that this modulation is performed by acidic isoferritin "bridging" iron from ribonucleotide reductase to maturation-linked haem-containing cytoplasmic enzymes.

REFERÊNCIAS

1 - TILL J.E. & MCCULLOCH E.A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiation Res.** 14: 213

2 - LEWIS J.P. & TROBAUGH F.E.Jr (1964) Haematopoietic stem cells. **Nature** 204:589

3 - FOWLER J.H., WU A.M., TILL J.E., MCCULLOCH E.A. & SIMINOVITCH L. (1967) The cellular composition of hemopoietic spleen colonies. **J. Cell. Physiol.** 69:65

4 - SIMINOVITCH L., MCCULLOCH E.A. & TILL J.E. (1963) The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. **J. Cell. Comparat. Physiol.** 62:327

5 - BECKER A.J., MCCULLOCH E.A. & TILL J.E. (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from mouse marrow cells. **Nature** 197: 452

6 - WU A.M., TILL J.E., SIMINOVITCH L. & MCCULLOCH E.A. (1967) A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. **J. Cell. Physiol.** 69:177

7 - WU A.M., TILL J.E., SIMINOVITCH L. & MCCULLOCH E.A. (1968) Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid sistem. **J. Exp. Med.** 127: 455

8 - TILL J.E., MCCULLOCH E.A. & SIMINOVITCH L. (1964) A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony forming cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 51:29

9 - LAJTHA L.G. & SCHOFIELD R. (1971) Regulation of stem cell renewal and differentiation: possible significance in ageing. In **Advances in Gerontological Research** (Ed. Strehler, B.L.), pp. 131-146. New York: Academic Press

10 - VOGEL H., NIEWISCH H. & MATIOLI G. (1968) The self-renewal probability of hemopoietic stem cells. **J. Cell. Physiol.** 72:221

11 - JACOBSON L.O., MARKS E.K., GASTON E.O., ROBSON M.J. & ZIRKLE R.E. (1949) Role of the spleen in radiation injury. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 70:7440

12 - HANKS G.E. (1964) In vivo migration of colony-forming units from shielded bone marrow in the irradiated mouse. **Nature** 203:1393

13 - CROIZAT H., FRINDEL E. & TUBIANA M. (1970) Proliferative activity of stem cells in bone marrow of mice after single and multiple irradiations (total or partial body exposure). **Intern. J. Radiation Biol.** 18:347

14 - GIDALI J. & LAJTHA L.G. (1972) Regulation of haemopoietic stem cell turnover in partially irradiated mice. **Cell Tissue Kinetics** 5:147

15 - WORTON R.G., MCCULLOCH E.A. & TILL J.E. (1969) Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal. **J. Exp. Med.** 130:91

16 - BECKER A.J., MCCULLOCH E.A., SIMINOVITCH L. & TILL J.E. (1965) The effect of differing demands for blood cell production on DNA synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice. **Blood** 26:296

17 - VASSORT F., WINTERHOLER M., FRINDEL E. & TUBIANA M. (1973) Kinetic parameters of bone marrow stem cells using in vivo suicide by tritiated thymidine or by hydroxyurea. **Blood** 41:789

18 - GUZMAN E. & LAJTHA L.G. (1970) Some comparisons of kinetic properties of femoral and splenic haemopoietic stem cells. **Cell Tissue Kinetics** 3:91

19 - HENDRY J.H. & LAJTHA L.G. (1972) The response of haemopoietic colony-forming units to repeated doses of X-rays. **Radiation Res.** 52:309

20 - SCHOFIELD R. (1978) The relationship between the spleen colony forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood Cells** 4:7

21 - PLUZNIK D.H. & SACHS L. (1965) The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. **J. Cell. Comparat. Physiol.** 66:319

22 - BRADLEY T.R. & METCALF D. (1966) The growth of mouse bone marrow cells in vitro. **Austral. J. Exp. Med. Sci.** 44:287

23 - PIKE B. & ROBINSON W.A. (1970) Human bone marrow colony growth in agar gel. **J. Cell. Physiol.** 76:77

24 - MOORE M.A.S., WILLIAMS N. & METCALF D. (1972) Purification and characterisation of the in vitro colony forming cells in monkey hemopoietic tissue. **J. Cell. Physiol.** 79:283

25 - JOHNSON G.R. & METCALF D. (1977) Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74:3879

26 - ENTRINGER M.A., ROBINSON W.A. & KURNICK J.E. (1977) Colony growth of normal human bone marrow in agar gel. **Exp. Hematol.** 5:125

27 - RICHMAN C.M., WEINER R.S. & YANKEE R.A. (1976) Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. **Blood** 47:1031

28 - BOL S., VISSER J., WILLIAMS N. & VAN DEN ENGH G. (1977) Physical characterization of haemopoietic progenitor cells by equilibrium density centrifugation. In **Cell Separation Methods** (Ed. Bloemendal, H.), p. 39. Amsterdam: Elsevier/North Holland

29 - FRANCIS G.E., BERNEY J.J., BODGER M.P., BOL S.J.L., WING M.A. & HOFFBRAND A.V. (1981) Clone size potential and sensitivity to colony stimulating activity: differentiation-linked properties of granulocyte-macrophage progenitor cells. **Stem Cells** 1: 124

30 - GUIMARAES J.E., FRANCIS G.E., BOL S.J.L., BERNEY J.J. & HOFFBRAND A.V. (1982) Differentiation restriction in the neutrophil-granulocyte, macrophage, eosinophil-granulocyte pathway: analysis by equilibrium density centrifugation. **Leukemia Res.** 6:791

31 - FRANCIS G.E., WING M.A., BERNEY J.J. & GUIMARAES J.E.T. (1983) CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-MK: Analysis by equilibrium density contrifugation. **Exp. Hematol.** 11:481

32 - FRANCIS G.E., BOL S. & BERNEY J.J. (1981) Proliferative capacity, sensitivity to colony stimulating activity and buoyant density: linked properties of granulocyte-macrophage progenitors from normal human bone marrow. **Leukemia Res.** 5:243

33 - MOORE M.A.S., WILLIAMS N. & METCALF D. (1973) In vitro colony formation by normal and leukemic human hemopoietic cells. Characterization of the colony-forming cells, **J. Natl. Cancer Inst.** 50:603

34 - BROXMEYER H.E., GALBRAITH P.R. & BAKER F.L. (1976) Relationship of colony-stimulating activity to apparent kill of human colony-forming cells by irradiation and hydroxyurea. **Blood** 47:403

35 - SENN J.S. & MCCULLOCH E.A. (1970) Radiation sensitivity of human bone marrow cells measured by a cell culture method. **Blood** 35:56

36 - RICKARD K.A., BROWN R. & KRONENBERG H. (1974) Radiation and the human agar colony forming cell. **Pathology** 6:169

37 - WINCHESTER R.J., ROSS G.D., JAROWSKI C.I., WANG C.Y., HALPER J. & BROXMEYER H.E. (1977) Expression of Ia-like antigen molecules on human granulocytes during early phases of differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74:4012

38 - JANOSSY G., FRANCIS G.E., CAPELLARO D., GOLDSTONE A.H. & GREAVES M.F. (1978) Cell sorter analysis of leukemia-associated antigens on human myeloid precursors. **Nature** 276:176

39 - CLINE M.J. & BILLING R. (1977) Antigens expressed by human B-lymphocytes and myeloid stem cells. **J. Exp. Med.** 146:1143

40 - SIEFF C., BICKNELL D., CAINE G., ROBINSON J., LAM G. & GREAVES M. (1982) Changes in cell surface antigen expression during haemopoietic differentiation. **Blood** 60:703

41 - RABELLINO E.M., ROSS G.D., TRANG HOANG T.K., WILLIAMS N. & METCALF D. (1978) Membrane receptors on mouse leukocytes. II. Sequential expression of membrane receptors and phagocytic capacity during leukocyte differentiation. **J. Exp. Med.** 147:434

42 - RICHMAN C.M., CHESS L. & YANKEE R.A. (1978) Purification and characterization of granulocyte progenitor cells (CFU-C) from human peripheral blood using immunologic surface markers. **Blood** 51:1

43 - STEPHENSON J.R., AXELRAD A.A., MCLEOD D.L. & SHREEVE M.M. (1971) Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 68:1542

44 - AXELRAD A.A., MCLEOD D.L., SHREEVE M.M. & HEATH D.A. (1974) Properties of cells that produce erythrocytic colonies in vitro. In **Hemopoiesis in Culture** (Ed. Robinson W.), pp. 226-234. Washington: U.S. Government Printing Office

45 - ISCOVE N.N., SIEBER F. & WINTERHALTER K.H. (1974) Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. **J. Cell. Physiol.** 83:309

46 - MCLEOD D.L., SHREEVE M.M. & AXELRAD A.A. (1976) Induction of megakaryocytic colonies with platelet formation in vitro. **Nature** 261: 492

47 - VAINCHENKER W., BOUGUET J., GUICHARD J. & BRETON-GORIUS J. (1979) Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors. **Blood** 54:940

48 - FAUSER A.A. & MESSNER H.A. (1978) Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood and cord blood. **Blood** 52:1243

49 - FAUSER A.A. & MESSNER H.A. (1979) Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. **Blood** 53:1023

50 - FAUSER A.A. & LOHR G.W. (1982) Recloned colonies positive for T-cell associated antigen derived from mixed hemopoietic colonies (CFU-GEMM). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 170:220

51 - PORTER P.N., SUDA T., SUDA J., AVILA L.A., BERGMAN K.B. & OGAWA M. (1983) Analysis of mixed hemopoietic colonies containing mast cells. **Exp. Hematol.** 11 (Suppl. 14): Abs 194

52 - AGLIETTA M., CAMUSSI G. & PIACIBELLO W. (1981) Detection of basophils growing in semi-solid agar cultures. **Exp. Hematol.** 9:95

53 - DENBURG J.A., RICHARDSON M., TELIZYN S. & BIENENSTOCK J. (1983) Basophil/mast cell precursors in human peripheral blood. **Blood** 61:775

54 - GUIMARAES J.E., BERNEY J.J., FRANCIS G.E. & HOFFBRAND A.V. (1984) The identification of mixed granulocytic-erythrocytic colonies in vitro. **Exp. Hematol.** 12:535

55 - MESSNER H.A. & FAUSER A.A. (1980) Culture studies of human pluripotent hemopoietic progenitors. **Blut** 41:327

56 - POWELL J.S., FIALKOW P.J. & ADAMSON J.W. (1982) Polycythemia vera: studies of hemopoiesis in continuous long-term culture of human marrow. **J. Cell. Physiol.** (Suppl. 1):79

57 - YOFFEY J.M. (1980) Transitional cells of haemopoietic tissues: origin, structure and development potential. **Int. Rev. Cytol.** 62:311

58 - MESSNER H.A., FAUSER A.A., LEPINE J. & MARTIN M. (1980) Properties of human pluripotent hemopoietic progenitors. **Blood Cells** 6: 595

59 - JOHNSON G.R. & METCALF D. (1978) Nature of cells forming erythroid colonies in agar after stimulation by spleen conditioned medium. **J. Cell. Physiol.** 94:243

60 - NEUMANN H.A., LOHR G.W. & FAUSER A.A. (1981) Radiation sensitivity of pluripotent hemopoietic progenitors (CFU-GEMM) derived from human bone marrow. **Exp. Hematol.** 9:742

61 - FITCHEN J.H., LE FEVRE C., FERRONE S. & CLINE M.J. (1982) Expression of Ia-like and HLA-A,B antigens on human multipotential hematopoietic progenitor cells. **Blood** 59:188

62 - BODGER M.P., IZAGUIRRE C.A., BLACKLOCK H.A. & HOFFBRAND A.V. (1983) Surface antigenic determinants on human pluripotent and unipotent hematopoietic progenitor cells. **Blood** 61:1006

63 - TINDLE R.W., NICHOLS R.A.B., CHAN L.C., CAMPANA D., CATOVSKY D. & BIRNIE G.D. (1985) A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognizes myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crisis and reacts with immature cells in normal bone marrow. **Leukemia Res.** 9:583

64 - KATZ F.E., TINDLE R., SUTHERLAND D.R. & GREAVES M.F. (1985) Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. **Leukemia Res.** 9:191

65 - CIVIN C.I., STRAUSS L.C., BROVALL C., FACKLER M.J., SCHWARTZ J.F. & SHAPER J.H. (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. **J. Immunol.** 133:157

66 - JOHNSON G.R. (1980) Colony formation in agar by adult bone marrow multipotential hemopoietic cells. **J. Cell. Physiol.** 103:371

67 - ASH R.C., DERRICK R.A. & ZANJANI E.D. (1981) Studies of human pluripotent hemopoietic stem cells (CFU-GEMM) in vitro. **Blood** 58:309

68 - NAKAHATA T. & OGAWA M. (1982) Identification in culture of a class of hemopoietic colony--forming units with extensive capacity to self-renew and generate multipotential colonies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79:3843

69 - NAKAHATA T., GROSS A. J. & OGAWA M. (1982) A stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in culture. **J. Cell. Physiol.** 113:455

70 - IHLE J. N., KELLER J., HENDERSON L., KLEIN F. & PALASZYNSKI E. (1982) Procedures for the purification of interleukin-3 to homogeneity. **J. Immunol.** 129:2431.

71 - ISCOVE N. N. (1978) Erythropoietin-independent stimulation of early erythropoiesis in adult marrow cultures by conditioned media from lectin-stimulated mouse spleen cells. In **Hematopoietic Cell Differentiaton, ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology,** vol. 10 (Eds. Golde D. W., Cline M. J., Metcalf D. & Fox F. C.), pp. 37-52. New York: Academic Press.

72 - BAZILL G. W., HAYNES M., GARLAND J. & DEXTER T. M. (1983) Characterization and partial purification of a hemopoietic cell growth factor in WEHI-3 cell conditioned medium. **Biochemical J.** 210:747.

73 - CLARK-LEWIS I. & SCHRADER J. W. (1981) P cell-stimulating factor: biochemical characterization of a new T cell-derived factor. **J. Immunol.** 127:1941.

74 - SCHRADER J. W., LEWIS S. J., CLARK-LEWIS I. & CULVENOR J. G. (1981) The persisting (P) cell: histamine content regulation by a T cell-derived factor, origin from a bone marrow precursor, and relationship to mast cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78:323.

75 - WELTE K., PLATZER E., LU L., GABRILOVE J. L., LEVI E., MERTELSMANN R. & MOORE M.A.S. (1985) Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82:1526

76 - RALPH P., BROXMEYER H. E., MOORE M.A.S. & NAKOINZ I. (1978) Induction of myeloid colony-stimulating activity in murine monocyte tumor cell lines by macrophage activators and in a T-cell line by concanavalin A. **Cancer Res.** 38:1414

77 - METCALF D. & JOHNSON G.R. (1978) Production by spleen and lymph node cells of conditioned medium with erythroid and other hemopoietic colony stimulating activity. **J. Cell. Physiol.** 96:31

78 - SCHREIER M.H. & ISCOVE N.N. (1980) Haematopoietic growth factors are released in cultures of H-2 restricted helper T cells, acessory cells and specific antigen. **Nature** 287:228

79 - STABER F.G., HULTNER L., MARCUCCI F. & KRAMER P.H. (1982) Production of colony--stimulating factors by murine T cells in limiting dilution and long-term cultures. **Nature** 298:79

80 - FUNG M.C., HAPEL A.J., YMER S., COHEN D.R., JOHNSON R.N., CAMPBELL H.D. & YOUNG I.G. (1984) Molecular cloning of cDNA for mouse interleukin-3. **Nature** 307:233

81 - YOKOTA T., LEE F., RENNICK D., HALL C., ARAI N., MOSMANN T., NABEL I.G., CANTOR H. & ARAI K. (1984) Isolation and characterization of a full-length cDNA for mast cell growth factor from a mouse T-cell clone: expression in monkey kidneys. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81:1070

82 - REISSMANN K.R. (1950) Studies on the mechanism of erytropoietin stimulation in parabiotic rats during hypoxia. **Blood** 5:372

83 - JACOBSON L.O., GOLDWASSER E., PLZAK L.F. & FRIED W. (1957) Studies on erythropoiesis. IV. Reticulocyte response of hypophysectomized and polycythemic rodents to erythropoietin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 94:243

84 - GREGORY C.J. (1976) Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture. **J. Cell. Physiol.** 89:289

85 - VAN ZANT G. & GOLDWASSER E. (1977) The simultaneous effects of erythropoietin and colony stimulating factor on bone marrow cells. **Science** 198:733

86 - MIYAKE T., KUNG C. K.-H. & GOLDWASSER E. (1977). Purification of human erythropoietin. **J. Biol. Chem.** 252:5558

87 - KAWAKITA M., OGAWA M., GOLDWASSER E. & MIYAKE T. (1983) Characterization of human megakaryocyte colony-stimulating factor in the urinary extracts from patients with aplastic anemia and idiopatic thrombocytopenic purpura. **Blood** 61:556

88 - MCDONALD T.P. (1981) Annotation : Assay and site of production of thrombopoietin. **Brit. J. Haematol.** 49:493

89 - BURGESS A.W., CAMAKARIS J. & METCALF D. (1977) Purification and properties of a colony stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. **J. Biol. Chem.** 252:1998

90 - METCALF D. & JOHNSON G.R. (1979) Interactions between purified GM-CSF, purified erythropoietin and spleen conditioned medium on hemopoietic colony formation in vitro. **J. Cell. Physiol.** 99:159

91 - METCALF D., JOHNSON G.R. & BURGESS A.W. (1980) Direct stimulation by purified GM-CSF on the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells. **Blood** 55:138

92 - GASSON J.C., WEISBART R.H., KAUFMAN S.E., CLARK S.C., HEWICK R.M., WONG G.G. & GOLDE D.W. (1984) Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. **Science** 226:1339

93 - GOUGH N.M., GOUGH J., METCALF D., KELSO A., GRAIL D., NICOLA N., BURGESS A.W. & DUNN A.R. (1984) Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. **Nature** 309:763

94 - WONG G.G., WITEK J., TEMPLE P.A., WILKENS K.M., LEARY A.C., LUXEMBERG D.P., JONES S.S., BROWN E.C., KAY R.M., ORR E.C., SHOEMAKER C., GOLDE D.W., KAUFMAN R.J., HEWICK R.M., WANG E.A. & CLARK S.C. (1985) Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. **Science** 228:810

95 - LEE F., YOKOTA T., OTSUKA T., GEMMELL L., LARSON N., LUH J., ARAI K.I. & RENNICK D. (1985) Isolation of a cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82:4360

96 - NICOLA N.A., METCALF D., MATSUMOTO M. & JOHNSON G.R. (1983) Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells: identification as granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). **J. Biol. Chem.** 258:9017

97 - STANLEY E.R. & HEARD P.M. (1977) Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. **J. Biol. Chem.** 252:4305

98 - NICOLA N.A., METCALF D., JOHNSON G.R. & BURGESS A.W. (1979) Separation of functionally distinct human granulocyte-macrophage stimulating factors. **Blood** 54:614

99 - TUSHINSKI R.J., OLIVER I.T., GUILBERT L.J., TYNAN P.N., WARNER J.W. & STANLEY E.R. (1982) Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. **Cell** 28:71

100 - GUILBERT L.J. & STANLEY E.R. (1980) Specific interaction of murine colony stimulating factor with mononuclear phagocytic cells. **J. Cell Biol.** 85:153

101 - BYRNE P. V., GUILBERT L.J. & STANLEY E.R. (1981) Distribution of cells bearing receptors for a colony stimulating factor (CSF-1) in murine tissues. **J. Cell Biol.** 91:848

102 - CARPENTER G. & COHEN S. (1976) ^{125}I - labelled human epidermal growth factor: binding, internalization and degradation in human fibroblasts. **J. Cell Biol.** 71:159

103 - COOPER J.A., BOWEN-POPE D.F., RAINES E., ROSS R.& HUNTER T. (1982) Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. **Cell** 31:263

104 - PETRUZZELLI L.M., GANGULY S., SMITH C.J., COBB M.H., RUBIN C.S. & ROSEN O.M. (1982) Insulin activates a tyrosine-specific protein kinase in extracts of 3T3-L1 adipocytes and human placenta. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79:6792

105 - GROFFEN J., HEISTERKAMP N., REYNOLDS F.H. & STEPHENSON J.R. (1983) Homology between phosphotyrosine acceptor site of human c-abl and viral oncogene products. **Nature** 304:167

106 - BISHOP J.M. (1983) Cellular oncogenes and retroviruses. **Annu. Rev. Biochem.** 52:301

107 - TUSHINSKI R.J. & STANLEY E.R. (1983) The regulation of macrophage protein turnover by a colony stimulating factor (CSF-1). **J. Cell. Physiol.** 116:67

108 - WATERFIELD M.D., SCRACE G.T., WHITTLE N., STROOBANT P., JOHNSON A., WASTESON A., WESTERMARK B., HELDIN C.-H., HUANG J.S. & DEUEL T.F. (1983) Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28^{sis} of Simian sarcoma virus. **Nature** 304:35

109 - DOOLITTLE R.F., HUNKAPILLER M.W., HOOD L.E., DEVARE S.G., ROBBINS K.C., AARONSON S.A. & ANTONIADES H.N. (1983) Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. **Science** 221:275

110 - DOWNWARD J., YARDEN Y., MAYES E., SCRACE G., TOTTY N., STOCKWELL P., ULLRICH A., SCHLESSINGER J. & WATERFIELD M.D. (1984) Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-b oncogene protein sequences. **Nature** 307:521

111 - ROBBINS K.C., ANTONIADES H.N., DEVARE S.G., HUNKAPILLER M.W. & AARONSON S.A. (1983) Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. **Nature** 305:605

112 - DEUEL T.F.,HUANG J.S., HUANG S.S., STROOBANT P. & WATERFIELD M.D. (1983) Expression of a platelet-derived growth factor-like protein in Simian sarcoma virus transformed cells. **Science** 221:1348

113 - DASIDAR P.G. & FOX C.F. (1983) Epidermal growth factor receptor dependent phosphorylation of a Mr=34000 protein substrate for pp60^{src}. **J. Biol. Chem.** 258:2041

114 - SPORN M. B. & ROBERTS A.B. (1985) Autocrine growth factors and cancer. **Nature** 313:745

115 - SHERR C.J., RETTENMIER C.W., SACCA R., ROUSSEL M.F., LOOK A.T. & STANLEY E.R. (1985) The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. **Cell** 41:665

116 - BRADLEY T.R. & HODGSON G.S. (1979) Detection of primitive macrophage progenitor cells in mouse bone marrow. **Blood** 54:1446

117 - ISCOVE N.N., ROITSCH C.A., WILLIAMS N. & GUILBERT L.J. (1982) Molecules stimulating early red cell, granulocyte, macrophage, megakaryocyte precursors in culture: similarity in size, hydrophobicity and charge. **J. Cell. Physiol.** (Suppl. 1):65

118 - OGAWA M., PORTER P.N. & NAKAHATA T. (1983) Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells (An interpretive review). **Blood** 61:823

119 - JOHNSON G.R. (1981) Is erythropoiesis an obligatory step in the commitment of multipotential hematopoietic stem cells? In **Experimental Hematology Today** (Eds. Baum S.J., Ledney G.D. & Khan A.),pp. 13-20. Basel: Karger

120 - NICOLA N. & JOHNSON G.R. (1982) The production of committed hemopoietic colony-forming cells from multipotential precursor cells in vitro. **Blood** 60:1019

121 - MCLEOD D.L., SHREEVE M.M. & AXELRAD A.A. (1980) Chromosome marker evidence for the bipotentiality of BFU-E. **Blood** 56:318

122 - ISCOVE N.N., GUILBERT L.J. & WEYMAN C. (1980) Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol. **Exp. Cell Res.** 126:121

123 - TRENTIN J.J. (1970) Influence of hematopoietic organstroma (Hematopoietic Inductive Microenvironments) on stem cell differentiation. In **Regulation of Hematopoiesis** (Ed. Gordon A.S.), p. 161. New York: Appleton-Century-Crofts.

124 - VAN ZANT G. & GOLDWASSER E. (1979) Competition between erythropoietin and colony-stimulating factor for target cells in mouse marrow. **Blood** 53:946

125 - DEXTER T.M. (1982) Stromal cell associated hemopoiesis. **J. Cell. Physiol.** (Suppl. 1):87

126 - METCALF D., MCDONALD H.R. & CHESTER H.M. (1975) Serum potentiation of granulocyte and macrophage colony formation in vitro. **Exp. Hematol.** 3:261

127 - METCALF D. & MOORE M.A.S. (1971) **Haemopoietic Cells.** Amsterdam: North Holland.

128 - SHAH R.G., GREEN S. & MOORE M.A.S. (1978) Colony stimulating and inhibiting activities in mouse serum after Corynebacterium parvum endotoxin treatment. **J. Reticuloendothelial Society** 23:29

129 - APTE R.N., HERTOGS C.F. & PLUZNIK D.H. (1977) Regulation of lipopolysaccharide-induced granulopoiesis and macrophage formation by lymphoid cells. I. Relationship between colony stimulating factor release and lymphocyte activation in vitro. **J. Immunol.** 118:1435

130 - HEIT W., KERN P., KUBANEK B. & HEIMPEL H. (1974) Some factors influencing granulocyte colony formation in vitro by human white blood cells. **Blood** 44:511

131 - GREENBERG P.L. & MOSNY S.A. (1977) Cytotoxic effects of interferon in vitro on granulocytic progenitor cells. **Cancer Res.** 37: 1794

132 - VAN'T HULL E., SCHELLEKENS H., LAVENBERG B. & DE VRIES M.J. (1978) Influence of interferon preparations on the proliferative capacity of human and mouse bone marrow cells in vitro. **Cancer Res.** 38:911

133 - CARSWELL E.A., OLD L.J., KASSEL R.L., GREEN S., FIORE N. & WILLIAMSON B. (1975) An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 72:3666

134 - FRIEDMAN D.L. (1976) Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation. **Physiol. Reviews** 56:652

135 - KURLAND J.I., HADDEN J.W. & MOORE M.A.S. (1977) Role of cyclic nucleotides in the proliferation of committed granulocyte-macrophage progenitor cells. **Cancer Res.** 37:4534

136 - KURLAND J. & MOORE M.A.S. (1977) Modulation of hemopoiesis by prostaglandins. **Exp. Hematol.** 5:357

137 - KURLAND J., BOCKMAN R., BROXMEYER H. & MOORE M. (1978) Limitation of excessive myelopoiesis by the intrinsic modulation of macrophage-derived prostaglandin E. **Science** 199:552

138 - PELUS L.M. (1982) Association between colony forming units-granulocyte macrophage expression of Ia-like (HLA-DR) antigen and control of granulocyte and macrophage production. **J. Clin. Invest.** 70:568

139 - KURLAND J., KINCADE P.W. & MOORE M.A.S. (1977) Regulation of B lymphocyte clonal proliferation by stimulatory and inhibitory macrophage-derived factors. **J. Exp. Med.** 146:1420

140 - KURLAND J. & MOORE M.A.S. (1977) The regulatory role of the macrophage in normal and neoplastic hemopoiesis. In **Experimental Hematology Today**, Vol. II (Eds. Baum S. & Ledney G.), p. 51. Berlin: Springer-Verlag

141 - DUKES P.P., SHORE N.A., HAMMOND D.J., ORTEGA J.A. & DATTA M.C. (1973) Enhancement of erythropoiesis by prostaglandins. **J. Laborat. Clin. Med.** 82:704

142 - KURLAND J.I., BROXMEYER H.E., PELUS L.M., BOCKMAN R.S. & MOORE M.A.S. (1978) Role of monocyte-macrophage derived colony stimulating factor and prostaglandin E in the positive and negative feedback control of myeloid stem cell proliferation. **Blood** 52:388

143 - PELUS L.M., BROXMEYER H.E., KURLAND J.I. & MOORE M.A.S. (1979) Regulation of macrophage and granulocyte proliferation: specificities of prostaglandin E and lactoferrin. **J. Exp. Med.** 150:277

144 - BROXMEYER H.E., MOORE M.A.S. & RALPH P. (1977) Cell-free granulocyte colony inhibiting activity derived from human PMN. **Exp. Hematol.** 5:87

145 - MENDELSOHN N., EGER R.R., BROXMEYER H.E. & MOORE M.A.S. (1978) Isolation of a granulocyte colony inhibitory factor derived from human polymorphonuclear neutrophils. **Biochim. Biophys. Acta** 533:238

146 - BROXMEYER H.E., SMITHYMAN A., EGER R.R., MEYERS P.A. & DE SOUSA M. (1978) Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colony-stimulating activity production. **J. Exp. Med.** 148:1052

147 - BULLEN J.J. & ARMSTRONG J.A. (1979) The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. **Immunology** 36:781

148 - BROXMEYER H.E., MENDELSOHN N. & MOORE M.A.S. (1977) Abnormal granulocyte feedback regulation of colony stimulating activity-producing cells from patients with chronic myelogenous leukemia. **Leukemia Res.** 1:3

149 - OLOFSSON T., OLSSON I. & VERGE P. (1977) Myeloperoxidase and lactoferrin of blood neutrophils and plasma in chronic granulocytic leukemia. **Scandin. J. Haematol.** 18:113

150 - MASON D.Y. (1977) Intracellular lysozyme and lactoferrin in myeloproliferative disorders. **J. Clin. Path.** 30:541

151 - RABE K., REHPENNING W., WINKLER K., HEINISCH B., KRAUSE U., SOLTAU H. & NETH R. (1983) Persistent deficiency of myeloperoxidase and lactoferrin in granulopoietic cells of patients with acute leukemia. **Haematology and Blood Transfusion,** Vol. 28, **Modern Trends in Human Leukemia V** (Eds. Neth, Gallo, Greaves, Moore & Winkler), pp. 362-365. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag

152 - BROWN R.D., RICKARD K.A. & KRONENBERG H. (1985) Lactoferrin in the myeloproliferative disorders: a search for granulopoietic regulator defects. **Brit. J. Haematol.** 59:617

153 - BROXMEYER H.E., JACOBSEN N., KURLAND J., MENDELSOHN N. & MOORE M.A.S. (1978) In vitro suppression of normal granulocytic stem cells by inhibitory activity derived from human leukemic cells. **J. Natl. Cancer Instit.** 60:497

154 - BROXMEYER H.E., GROSSBARD E., JACOBSEN N. & MOORE M.A.S. (1978) Evidence for a proliferative advantage of human leukemic colony forming cells (CFU-c) in vitro. **J. Natl. Cancer Instit.** 60:513

155 - OLOFSSON T. & OLSSON I.L. (1980) Suppression of normal granulopoiesis in vitro by a leukemia associated inhibitor (LAI) derived from a human promyelocytic cell line (HL60). **Leukemia Res.** 4:437

156 - TRUCCO M., ROVERA G. & FERRERO D. (1984) A novel human lymphokine that inhibits hematopoietic progenitor cell proliferation. **Nature** 309:166

157 - BROXMEYER H.E., BOGNACKI J., DORNER M.H. & DE SOUSA M. (1981) The identification of leukemia associated inhibitory activity (LIA) as acidic isoferritin: A regulatory role for acidic isoferritin in the production of granulocytes and macrophages. **J. Exp. Med.** 153:1426

158 - BROXMEYER H.E. (1982) Relationship of cell-cycle expression of Ia-like antigenic determinants on normal and leukemia human granulocyte-macrophage progenitor cells to regulation in vitro by acidic isoferritins. **J. Clin. Invest.** 69:632

159 - LU L., BROXMEYER H.E., MEYERS P.A., MOORE M.A.S. & THALER H.T. (1983) Association of cell cycle expression of Ia-like antigenic determinants on normal human multipotential (CFU-GEMM) and erythroid (BFU-E) progenitor cells with regulation in vitro by acidic isoferritins. **Blood** 61:250

160 - TAETLE R. (1981) Acidic isoferritins (leukemia associated inhibitory activity) fail to inhibit blast proliferation in acute myelogenous leukemia. **Blood** 58:653

161 - BROXMEYER H.E., BOGNACKI J., RALPH P., DORNER M.H., LU L. & CASTRO-MALASPINA H. (1982) Monocyte-macrophage derived acidic isoferritins: normal feed-back regulators of granulocyte-macrophage progenitor cells. **Blood** 60:595

162 - BROXMEYER H.E., GENTILE P., BOGNACKI J. & RALPH P. (1983) Lactoferrin, transferrin and acidic isoferritins: regulatory molecules with potential therapeutic value in leukemia. **Blood Cells** 9:83

163 - ISCOVE N.N. (1984) Culture of lymphocytes and hemopoietic cells in serum-free medium. In **Methods for Serum-Free Culture of Neuronal and Lymphoid Cells**, pp. 169-185. New York: Alan R. Liss Inc.

164 - MICHALEVICZ R., FRANCIS G.E., PRICE G. & HOFFBRAND A.V. (1983) Platelet-derived growth factor (PDGF) promotes proliferation of GFU-GEMM in vitro. **Blood** 62 (Suppl. 1): 139a (Abs. 461)

165 - GUILBERT L.J. & ISCOVE N.N. (1976) Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. **Nature** 263:594

166 - METCALF D. (1977) **Hemopoietic Colonies.** Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 227 pp.

167 - LU L. & BROXMEYER H.E. (1985) Additive effects of phytohemagglutinin stimulated leukocyte conditioned medium, hemin, prostaglandin E and low oxygen tension on colony formation of erythroid progenitor cells from normal human bone marrow. **Exp. Hematol.** 13: 381 (Abs. 145)

168 - BUICK R.N., TILL J.E. & MCCULLOCH E.A. (1977) Colony assay for proliferative blast cells circulating in myeloblastic leukemia. **Lancet** i:862

169 - MINDEN M.D., BUICK R.N. & MCCULLOCH E.A. (1979) Separation of blast cell and T-lymphocyte progenitors in the blood of patients with acute myeloblastic leukemia. **Blood** 54:186

170 - LOWENBERG B. & HAGEMEJER A. (1978) Attempts at improving colony methods for human leukemic cells. **J. Supramol. Struct.** 182 (Suppl. 2): Abs. 461

171 - ROBINSON W.A., KURNICK J.E. & PIKE B.L. (1971) Colony growth of human leukemic peripheral blood cells in vitro. **Blood** 38:500

172 - AYE M.T., TILL J.E. & MCCULLOCH E.A. (1973) Cytological studies of colonies in culture derived from peripheral blood of two patients with acute leukemia. **Exp. Hematol.** 2:362

173 - MOORE M.A.S., SPITZER G., WILLIAMS N., METCALF D. & BUCKLEY J. (1974) Agar culture studies in 127 cases of untreated acute leukemia: the prognostic value of reclassification of leukemia according to in vitro growth characteristics. **Blood** 44:1

174 - SPITZER G., DICKE K.A., GEHAN E.A., SMITH T., MCCREDIE K.B., BARLOGIE B. & FREIREICH E.J. (1976) A simplified in vitro classification for prognosis in adult acute leukemia: the application of in vitro results in remission predictive models. **Blood** 48:795

175 - FRANCIS G.E., BERNEY J.J., CHIPPING P.M. & HOFFBRAND A.V. (1979) Stimulation of human haemopoietic cells by colony stimulating factors: sensitivity of leukaemic cells. **Brit. J. Haematol.** 41:545

176 - FRANCIS G.E., TUMA G.A., BERNEY J.J. & HOFFBRAND A.V. (1981) Sensitivity of acute myeloid leukaemia cells to colony stimulating activity: relation to response to chemotherapy. **Brit. J. Haematol.** 49:259

177 - KOEFFLER H.P. & GOLDE D.W. (1980) Human myeloid leukemia cell lines: a review. **Blood** 56:344

178 - LOZZIO C.B. & LOZZIO B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. **Blood** 45:321

179 - COLLINS S.J., GALLO R.C. & GALLAGHER R.E. (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. **Nature** 270:347

180 - MINOWADA J. (1982) Immunology of leukemic cells. In **Leukemia** (Eds. Gunz F. & Henderson E.), pp. 119-139. New York: Grune & Stratton

181 - KOEFFLER H.P. & GOLDE D.W. (1978) Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. **Science** 200: 1153

182 - SALAHUDDIN S.Z., MARKHAM P.D., MCCREDIE K.B., KONDO K., ROWLEY J.D. & GALLO R.C. (1982) Establishment, characterization and differentiation induction of a new human diploid myelomonocytic cell line (HL92) derived from a patient with acute myelomonocytic leukemia. **Leukemia Res.** 6:729

183 - SUNDSTROM C. & NILSSON K. (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). **Int. J. Cancer** 17:565

184 - TSUCHIYA S., YAMABE M., YAMAGUCHI Y., KOBAYASHI Y., KONNO T. & TADA K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **Int. J. Cancer** 26: 171

185 - MARTIN P. & PAPAYANNOPOULOU T. (1982) HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. **Science** 216:1233

186 - GUIMARAES J.E.T.E., FRANCIS G.E., WING M.A., BERNEY J.J., PRENTICE H.G. & HOFFBRAND A.V. (1984) Differentiation of human AML cells in response to CSA: an in vitro bioassay. **Brit. J. Haematol.** 58: 175

187 - SCHOLZEL C. & LOWENBERG B. (1983) Studies on acute myeloid leukemia in long term (Dexter type) culture. **Exp. Hematol.** 11 (Suppl. 14): 44

188 - ICHIKAWA Y. (1969) Differentiation of a cell line of myeloid leukemia. **J. Cell. Physiol.** 74:223

189 - ICHIKAWA Y. (1970) Further studies on the differentiation of a cell line of myeloid leukemia. **J. Cell. Physiol.** 76: 175

190 - PARAN M., SACHS L., BARAK Y. & RESNITSKY P. (1970) In vitro induction of granulocytic differentiation in hematopoietic cells from leukemic and non-leukemic patients. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 67: 1542

191 - SACHS L. (1978) Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. **Nature** 274: 535

192 - SACHS L. (1986) Growth, differentiation and the reversal of malignancy. **Sci. American** 254:30

193 - FIBACH E.T., LANDAU T. & SACHS L. (1972) Normal differentiation of myeloid leukemic cells induced by a differentiation-inducing protein. **Nature** (New Biology) 237:276

194 - FIBACH E. & SACHS L. (1975) Control of normal differentiation in myeloid leukemic cells. VIII. Induction of differentiation to mature granulocytes in mass culture. **J. Cell. Physiol.** 86:221

195 - LOTEM J., LIPTON J.H. & SACHS L. (1980) Separation of different molecular forms of macrophage- and granulocyte-inducing proteins for normal and leukemic myeloid cells. **Int. J. Cancer** 25:763

196 - OLSSON I., OLOFSSON T. & MAURITZON N. (1981) Characterization of mononuclear blood cell derived differentiation inducing factor(s) (DIFs) for the human promyelocytic leukemic cell line HL60. **J. Natl. Cancer Instit.** 67:1225

197 - MAEDA M., HORIUCHI M., NUMA S. & ICHIKAWA Y. (1977) Characterization of a differentiation stimulating factor for mouse leukemic cells. **Gann** 68:435

198 - SACHS L. (1980) Constitutive uncoupling of pathways of gene expression that control growth and differentiation in myeloid leukemia. A model for the origin and progression of malignancy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77:6512

199 - WEISINGER G. & SACHS L. (1983) DNA-binding protein that induces cell differentiation. **EMBO J.** 2:2103

200 - WEISINGER G., KORN A.P. & SACHS L. (1986) Protein that induces cell differentiation causes nicks in double-stranded DNA. **FEBS Lett.** 200: 107

201 - LOTEM J. & SACHS L. (1979) Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76:5158

202 - YAMAMOTO Y., TOMIDA M. & HOZUMI M. (1980) Production by mouse spleen cells of factors stimulating differentiation of mouse myeloid leukemic cells that differ from colony stimulating factor. **Cancer Res.** 40:4804

203 - BURGESS A. & METCALF D. (1980) Characterization of serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. **Int. J. Cancer** 26:647

204 - METCALF D. & NICOLA N.A. (1983) Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. **J. Cell. Physiol.** 116:198

205 - NICOLA N.A., MATSUMOTO M., METCALF D. & JOHNSON G.R. (1983) Molecular properties of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemic cells. **Haematology and Blood Transfusion**, Vol. 28, **Modern Trends in Human Leukemia V** (Eds. Neth, Gallo, Greaves, Moore & Winkler), pp. 345-347. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag

206 - OLSSON I., SARNGADHARAN M.G., BREITMAN T.R. & GALLO R.C. (1984) Isolation and characterization of a T-lymphocyte derived differentiation inducing factor (DIF) for myeloid leukemic cells. **Blood** 63:510

207 - LOTEM J. & SACHS L. (1977) Genetic dissection of the control of normal differentiation in myeloid leukemic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74:5554

208 - FRIEND C., SCHER W., HOLLAND J.G. & SATO T. (1971) Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro. Stimulation of erythroid differentiation by dimethylsulfoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 68:378

209 - RIFKIND R.A. & MARKS P. (1978) Regulation of differentiation in transformed erythroid cells. **Blood Cells** 4:189

210 - COLLINS S.J., RUSCETTI F.W., GALLAGHER R.E. & GALLO R.C. (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cell line (HL60) induced by dimethylsulfoxide and other polar planar compounds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75:2458

211 - BREITMAN T.R., SELONICK S.E. & COLLINS S.J. (1980) Induction of differentiation of human promyelocytic leukemia cell line (HL60) by retinoic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75:2936

212 - COLLINS S.J., BODNER A., TING R. & GALLO R.C. (1980) Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by compounds which induce differentiation of murine leukemia cells. **Int. J. Cancer** 25:213

213 - LOTEM J. & SACHS L. (1980) Potential pre-screening for therapeutic agents that induce differentiation in human myeloid leukemia cells. **Int. J. Cancer** 25:561

214 - KOEFFLER H.P., BAR-ELI M. & TERRITO M. (1979) Heterogeneity of human myeloid leukemia cell response to phorbol diester. **Blood 54** (Suppl. 1): 174a

215 - GALLAGHER R., COLLINS S., TRUJILLO J., MCCREDIE K., AHEARN M., TSAI S., METZGAR R., AULAKH G., TING R., RUSCETTI F. & GALLO R. (1979) Characterization of the continuous differentiating myeloid cell line (HL60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. **Blood 54**: 713

216 - NEWBURGER P.E., CHOVANIEK M.E., GREENBERGER J.S. & COHEN H.J. (1979) Functional changes in human leukemic cell line HL60. A model for myeloid differentiation. **J. Cell Biol.** 82:315

217 - FERRERO D., PESSANO S., PAGLIARDI G.L. & ROVERA G. (1983) Induction of differentiation of human myeloid leukemias: surface changes probed with monoclonal antibodies. **Blood** 61:171

218 - GRIFFIN J., MUNROE D., MAJOR P. & KUFE D. (1982) Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by inhibitors of DNA synthesis. **Exp. Hematol.** 10: 774

219 - BOYD A.W. & METCALF D. (1984) Induction of differentiation in HL60 leukaemic cells: a cell cycle dependent all-or-none event. **Leukemia Res.** 8:27

220 - BODNER A.J., TING R.C. & GALLO R.C. (1981) Induction of differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by nucleosides and methotrexate. **J. Natl. Cancer Instit.** 67:1025

221 - ROVERA G., SANTOLI D. & DAMSKY C. (1979) Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76:2774

222 - ABE E., MIYAURA C., SAKAGAMI H., TAKEDA M., KONNO K., YANZAKI T., YOSHIKI S. & SUDA T. (1981) Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α,25-dihydroxyvitamin D3. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78:4990

223 - MIYAURA C., ABE E., KURIBAYASHI T., TANAKA H., KONNO K., NISHII Y & SUDA T. (1981) 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of human myeloid leukemia cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 102:937

224 - MOORE M.A.S., GABRILOVE J. & SHERIDAN A.P. (1983) Myeloid leukemic cell differentiation induced by human postendotoxin serum and vitamin analogues. **Haematology and Blood Transfusion**, Vol. 28, **Modern Trends in Human Leukemia V** (Eds. Neth, Gallo, Greaves, Moore & Winkler), pp. 327-336. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag

225 - FIALKOW P.J., GARTLER S.M. & IOSHIDA A. (1967) Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 58:1468

226 - FIALKOW P.J., SINGER J.W., ADAMSON J.W., BERKOW R.L., FRIEDMAN J.M., JACOBSON R.J. & MOOHR J.W. (1979) Acute nonlymphocytic leukemia. Expression in cells restricted to granulocytic and monocytic differentiation. **N. Engl. J. Med.** 301:1

227 - PRCHAL J.T., THROCKMORTON D.W., CARROLL A.J. III, FUSON E.W., GAMS R.A. & PRCHAL J.F. (1978) A common progenitor for human myeloid and lymphoid cells. **Nature** 274:590

228 - FIALKOW P.J. (1979) Clonal origin of human tumors. **Annu. Rev. Med.** 30:135

229 - FIALKOW P.J., JACOBSON R.J. & PAPAYANNOPOULOU T. (1977) Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. **Am. J. Med.** 63:125

230 - LOTEM J. & SACHS L. (1974) Different blocks in the differentiation of myeloid leukemic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 71:3507

231 - GREAVES M. & JANOSSY G. (1978) Patterns of gene expression and the cellular origins of human leukaemias. **Biochim. Biophys. Acta** 516:193

232 - FRANCIS G.E., GRAY D.A., BERNEY J.J., WING M.A., GUIMARAES J.E.T. & HOFFBRAND A.V. (1983) Role of ADP-ribosyl transferase in differentiation of human granulocyte-macrophage progenitors to the macrophage lineage. **Blood** 62:1055

233 - JACOBS P., DUBOVSKY D., SMITH S., RANDALL G. & BRACHER M. (1979) Bone marrow culture in vitro: a technique for analysis and permanent recording of cellular composition. **Exp. Hematol.** 7:177

234 - MESSNER H.A., TILL J.E. & MCCULLOCH E.A. (1973) Interacting cell populations effecting granulopoietic colony formation by normal and leukemic marrow cells. **Blood** 42:701

235 - SVET-MOLDAVSKY G.J., ZINZAR S.N., SVET-MOLDAVSKAYA I.A., MANN P.E., HOLLAND J.F., FOGH J., ARLIN Z. & CLARKSON B.D. (1980) CSF-producing human tumor cell lines. Lack of CSF activity of human stromal bone marrow fibroblasts. **Exp. Hematol.** 8 (Suppl. 7):76

236 - RALPH P., WILLIAMS N., MOORE M.A.S. & LITCOFSKY P.B. (1982) Induction of antibody--independent and nonspecific tumor killing in human monocytic leukemia cells by nonlymphocyte factors and phorbol ester. **Cell. Immunol.** 71: 215

237 - AYE M.T., NIHO Y., TILL J.E. & MCCULLOCH E.A. (1974) Studies of leukemic cell populations in culture. **Blood** 44:205

238 - DAO C., METCALF D., ZITTOUN R. & BILSKI-PASQUIER G. (1977) Normal human bone marrow cultures in vitro: cellular composition and maturation of the granulocytic colonies. **Brit. J. Haematol.** 37:127

239 - FRANCIS G.E., BERNEY J.J. & HOFFBRAND A.V. (1977) Stimulation of human haemopoietic cells by colony stimulating factors: adherent cell dependent colony stimulating activity in human serum. **Brit. J. Haematol.** 35:625

240 - FINNEY D.J. (1971) **Statistical Method in Biological Assay.** London: C. Griffin & Co.

241 - LI C.Y., LAM K.W. & YAM L.T. (1973) Esterases in human leukocytes. **J. Histochem. Cytochem.** 21:1

242 - BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M-T., FLANDRIN G., GALTON D.A.G., GRALNICK H.R. & SULTAN C. (1985) Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7): a report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann. Int. Med.** 103: 460

243 - HAYHOE F.G.J. & QUAGLINO D. (1980) **Haematological Cytochemistry.** Edinburgh, London, New York: Churchill Livingstone

244 - SHOHAM D., BEN DAVID E. & ROZENSZAJN L.A. (1974) Cytochemical and morphologic identification of macrophages and eosinophils in tissue cultures of normal human bone marrow. **Blood** 44:221

245 - KARNOVSKY M.L. (1968) The metabolism of leukocytes. **Semin. Hematol.** 5:156

246 - REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., LEVEY R.H. & SCHLOSSMAN S.F. (1980) Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77:1588

247 - VERBI W., GREAVES M.F., KOUBEK K., JANOSSY G., STEIN H., KUNG P.C. & GOLDSTEIN G. (1982) OKT11 and OKT11a: monoclonal antibodies with pan T reactivity which block sheep erythrocyte "receptors" on T cells. **Eur. J. Immunol.** 12:81

248 - BASTIN J.M., GRANGER S., TIDMAN N., JANOSSY G. & MCMICHAEL A.J. (1981) Recognition of a human T-lymphocyte differentiation antigen by an IgM monoclonal antibody. **Clin. Exp. Immunol.** 46:597

249 - REINHERZ E.L. & SCHLOSSMAN S.F. (1980) The differentiation and function of human T lymphocytes. **Cell** 19:821

250 - JANOSSY G., CAMPANA D. & BOLLUM F.J. (1985) Immunofluorescence studies in leukaemia diagnosis. In **Methods in Haematology "Monoclonal Antibodies"** (Ed. Beverley P.), pp. 97-131. Churchill Livingstone

251 - GRANGER S.M., JANOSSY G., FRANCIS G.E., BLACKLOCK H.A., POULTER L.W. & HOFFBRAND A.V. (1982) Elimination of T lymphocytes from human bone marrow with monoclonal anti-T antibodies and cytolytic complement. **Brit. J. Haematol.** 50:367

252 - ROVIGATTI U., MIRRO J., KITCHINGMAN G., DAHL G., OCHS J., MURPHY S. & STASS S. (1984) Heavy chain immunoglobulin rearrangement in acute non-lymphoid leukaemia. **Blood** 63:1023

253 - TIDMAN N., JANOSSY G., BODGER M., GRANGER S., KUNG P.C. & GOLDSTEIN G. (1981) Delineation of human thymocyte differentiation pathways utilizing double-staining techniques with monoclonal antibodies. **Clin. Exp. Immunol.** 45:457

254 - LOEWE S. & MUISCHNEK H. (1926) Uber Kombinationswirkungen. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.** 114:313

255 - JONES B.M. & WORWOOD M. (1978) An immunoradiometric assay for the acidic ferritin of human heart: application to human tissues, cells and serum. **Clin. Chim. Acta** 85:81

256 - KEBERLE H. (1964) The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. **Annals N.Y. Acad. Sci.** 119:758

257 - JACOBS A. (1977) Low molecular weight intracellular iron transport compounds. **Blood** 50:433

258 - LEY T.J., GRIFFITH P. & NIENHUIS A.W. (1982) Transfusion hemosiderosis and chelation therapy. In **Clinics in Haematology**, Vol. 11, no.2 (Ed. Allan Jacobs), pp. 437-465. London, Philadelphia, Toronto: W.B. Saunders Co. Ltd

259 - KRAKOFF I.H., BROWN N.C. & REICHARD P. (1965) Inhibition of ribonucleotide reductase by hydroxyurea. **Cancer Res.** 28:1559

260 - OMARY M.B., TROWBRIDGE I.S. & MINOWADA J. (1980) Human cell surface glycoprotein with unusual properties. **Nature** 286:888

261 - SCHNEIDER C., SUTHERLAND R., NEWMAN R. & GREAVES M. (1982) Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9. **J. Biol. Chem.** 257: 8516

262 - VODINELICH L., SCHNEIDER C., SUTHERLAND D.R., NEWMAN R.A. & GREAVES M.F. (1983) Structure and function of the transferrin receptor: a possible role in the recognition of natural killer cells. **Haematology and Blood Transfusion**, Vol. 28, **Modern Trends in Human Leukemia V** (Eds. Neth, Gallo, Greaves, Moore & Winkler). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag

263 - DAUTRY-VARSAT A., CHIECHANOVER A. & LODISCH H.F. (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80:2258

264 - KLAUSNER R.D., ASHWELL G., VAN RENSWOUDE J., HARFORD J.B. & BRIDGES K.R. (1983) Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80: 2263

265 - AISEN P. & LISTOWSKY I. (1980) Iron transport and storage proteins. **Annu. Rev. Biochem.** 49:357

266 - ROSER H.P., LEE G.R. & NACHT S. (1970) The role of ceruloplasmin in iron metabolism. **J. Clin. Invest.** 49:2408

267 - TROWBRIDGE I.S. & OMARY M.B. (1981) Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78:3039

268 - SUTHERLAND R., DELIA D., SCHNEIDER C., NEWMAN R., KEMSHEAD J. & GREAVES M. (1981) Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78:4515

269 - TROWBRIDGE I.S. & LOPEZ F. (1982) Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79:1175

270 - TROWBRIDGE I.S. & DOMINGO D.L. (1981) Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells. **Nature** 294:171

271 - WEINSTEIN J.B., LEE L.S., FISHER P.B., MUFSON A. & YAMASAKI H. (1979) Action of phorbol esters in cell culture: mimery of transformation, altered differentiation and effects on cell membranes. **J. Supramol. Struct.** 12:195

272 - ROVERA G., O'BREINE T.A. & DIAMOND L. (1979) Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promotors. **Science** 204: 868

273 - HUBERMAN E. & CALLAHAN M.P. (1979) Induction of terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76: 293

274 - PIGA A., GANESHAGURU K., LEE N., BREATNACH F., PRENTICE H.G. & HOFFBRAND A.V. (1981) DNA synthesis in thymic acute lymphoblastic leukaemia. **Brit. J. Haematol.** 48:585

275 - VINDELOV L. (1977) Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. **Virchows Arch. B. Cell. Path.** 24:227

276 - BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.-T., FLANDRIN G., GALTON D.A.G., GRALNICK H.R. & SULTAN C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias: French-American-British Cooperative Group. **Brit. J. Haematol.** 33:451

277 - BENNETT J.M., CATOVSKY D., DANIEL M.-T., FLANDRIN G., GALTON D.A.G., GRALNICK H.R. & SULTAN C. The French-American-British (FAB) Cooperative Group (1982) Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Brit. J. Haematol.** 51:189

278 - PRENTICE H.G., BLACKLOCK H.A., JANOSSY G., GILMORE M.J.M.L., PRICE-JONES L., TIDMAN N., TREJDOSIEWICZ L.K., SKEGGS D.B.L., PANJWANI D., BALL S., GRAPHAKOS S., PATTERSON J., IVORY K. & HOFFBRAND A.V. (1984) Depletion of T-lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. **Lancet** i:472

279 - LOTEM J. & SACHS L. (1975) Control of normal differentiation of myeloid leukemic cells. VI. Inhibition of cell multiplication and the formation of macrophages. **J. Cell. Physiol.** 85:587

280 - GUSELLA J.F. & HOUSMAN D. (1976) Induction of erythroid differentiation in vitro by purine and purine analogues. **Cell** 8:263

281 - HARRISON P.M., CLEGG G.A. & MAY K. (1980) Ferritin structure and function. In **Iron in Biochemistry and Medicine II** (Eds. Jacobs A. & Worwood M.), pp. 131-171. London and New York: Academic Press

282 - DRYSDALE J.W. (1977) Ferritin phenotypes: structure and metabolism. In **Iron Metabolism, Ciba Foundation Symposium 51** (New Series), pp. 41-57. Amsterdam: Elsevier/Excerpta Medica/North Holland

283 - AROSIO P., ADELMAN T.G. & DRYSDALE J.W. (1978) On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. **J. Biol. Chem.** 253: 4451

284 - BROXMEYER H.E., LU L., BICKNELL D.C., SLEDGE G.W., WILLIAMS D., DIPPOLD W.G., HANGOC G., MCGUIRE W., COATES T. & COOPER S. (1985) The interacting roles of lactoferrin, transferrin and acidic isoferritins in the regulation of myelopoiesis in vitro and in vivo. In **Proteins of Iron Storage and Transport** (Eds. Spik G., Montreuil J., Crichton R.R. & Mazurier J.). Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)

285 - ISCOVE N.N. & MELCHERS F. (1978) Complete replacement of serum by albumin, transferrin and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. **J. Exp. Med.** 147:923

286 - HUTCHINGS S.E. & SATO G.H. (1978) Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75:901

287 - BARNES D. & SATO G. (1980) Serum free cell culture: a unifying approach. **Cell** 22:649

288 - RUDLAND P.S., DURBIN H., CLINGAN D. & DE ASUA L.J. (1977) Iron salts and transferrin are specifically required for cell division of cultured 3T6 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 75:556

289 - PEREZ-INFANTE V.Z. & MATHER J.P. (1982) The role of transferrin in the growth of testicular cell lines in serum-free medium. **Exp. Cell Res.** 142:325

290 - AISEN P. (1968) Citrate-mediated exchange of Fe^{3+} among transferrin molecules. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 32:220

291 - CLINE M.J., WARNER N.L. & METCALF D.(1972) Identification of the bone marrow colony mononuclear phagocyte as a macrophage. **Blood** 39:326

292 - CHERVENICK P.A. & BOGGS D.R. (1971) In vitro growth of granulocytic and mononuclear cell colonies from blood of normal individuals. **Blood** 37: 131

293 - CHIAO J.W., FREITAG W.F., STEINMETZ J.C. & ANDREEFF M. (1981) Changes of cellular markers during differentiation of HL-60 promyelocytes to macrophages as induced by T-lymphocyte conditioned medium. **Leukemia Res.** 5:477

294 - NICOLA N.A., BURGESS A.W. & METCALF D. (1979) Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors produced by different mouse organs in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.** 254:5290

295 - CLINE M.J. & GOLDE D.W. (1974) Production of colony-stimulating activity by human lymphocytes. **Nature** 248:703

296 - LINCH D.C., CAWLEY J.C., WORMAN C.P., GALVIN M.C., ROBERTS B.E., CALLARD R.E. & BEVERLEY P.C.L. (1981) Abnormalities of T-cell subsets in patients with neutropenia and an excess of lymphocytes in the bone marrow. **Brit. J. Haematol.** 48: 137

297 - BAGBY G.C. (1981) T lymphocytes involved in inhibition of granulopoiesis in two neutropenic patients are of the cytotoxic/suppressor (T3 + T8 +) subset. **J. Clin. Invest.** 68:1597

298 - NATHAN D.G., CHESS L., HILLMAN D.G., CLARKE B., BREARD J., MERLER E. & HAUSMAN D.E. (1978) Human erythroid burst forming unit: T-cell requirement for proliferation in vitro. **J. Exp. Med.** 147: 324

299 - LUSIS A.J., QUON D.H. & GOLDE D.W. (1981) Purification and characterization of a human T-lymphocyte-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Blood** 57:13

300 - FAUSER A.A., MESSNER H.A., LUSIS A.J. & GOLDE D.W. (1981) Stimulatory activity for human pluripotent hemopoietic progenitors produced by a human T-lymphocyte cell line. **Stem Cells** 1:73

301 - TARELLA C., RUSCETTI F.W., POIESZ B.J., WOODS A. & GALLO R.C. (1982) Factors that affect human hemopoiesis are produced by T-cell growth factor dependent and independent cultured T-cell leukemia-lymphoma cells. **Blood** 59:1330

302 - ASCENSAO J.L., KAY N.E., BANISADRE M. & ZANJANI E. (1981) Cell-cell interaction in human granulopoiesis: role of T lymphocytes. **Exp. Hematol.** 9:473

303 - BACIGALUPO A., PODESTA M., MINGARI M.C., MORETTA L., PIAGGIO G., VAN LINT M., DURANDO A. & MARMONT A.M. (1981) Generation of CFU-C/suppressor T cells in vitro: an experimental model for immune-mediated marrow failure. **Blood** 57:491

304 - KAGAN W.A., ASCENSAO J., PAHWA R., HANSEN J.A., GOLDSTEIN G., VALERA E.B., INCEFY G.S., MOORE M.A.S. & GOOD R.A. (1976) Aplastic anemia: presence in human bone marrow of cells that suppress myelopoiesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 73: 2890

305 - ASCENSAO J., KAGAN W., MOORE M.A.S., PAHWA R., HANSEN J. & GOOD R.A. (1976) Aplastic anemia: evidence for an immunological mechanism. **Lancet** i: 669

306 - HOFFMAN R., ZANJANI E.D., VILLI J., ZALUSKY R., LUTTON J.D. & WASSERMAN L.R. (1976) Diamond-Blackfan syndrome, lymphocyte mediated suppression of erythropoiesis. **Science** 193: 899

307 - HOFFMAN R., ZANJANI E.D., LUTTON J.D., ZALUSKY R. & WASSERMAN L.R. (1977) Suppression of erythroid colony formation by lymphocytes from patients with aplastic anemia. **N. Engl. J. Med.** 296: 10

308 - SHARKIS S.J., CREMO C., COLLECTOR M.I., NOGA S.J. & DONNENBERG A.D. (1986) Thymic regulation of hematopoiesis. III. Isolation of helper and suppressor populations using counterflow centrifugal elutriation. **Blood** 68:787

309 - VERMA D.S. (1982) Monocyte-macrophage interaction with T lymphocytes and its helper (T non-gamma) and suppressor (T gamma) subpopulations for the elaboration of burst promoting activity and the activity that stimulates mixed colonies (GMEEM-CFC) containing endothelial cells in man. **Exp. Hematol. Review, Exp. Hematol.** 10 (Suppl. 12):194

310 - TOROK-STORB B.J., MARTIN P.J. & HANSEN J.A. (1981) Regulation of in vitro erythropoiesis by normal T cells. Evidence for two T cell subsets with opposing function. **Blood** 58:171

311 - TOROK-STORB B.J. & HANSEN J.A. (1982) Modulation of in vitro BFU-E growth by normal Ia-positive T cells is restricted by HLA-DR. **Nature** 298:473

312 - CHIKKAPPA G. & PHILLIPS P.G. (1984) Regulation of normal human blood neutrophilic, macrophagic and eosinophilic committed stem cell proliferation by autologous blood T lymphocyte subsets. **Blood** 63:356

313 - HESKETH P.J., SULLIVAN R., VALERI C.R. & MCCARROLL L.A. (1984) The production of granulocyte-macrophage colony-stimulating activity by isolated human T lymphocyte subpopulations. **Blood** 63:1141

314 - BACON E.R., SING A.P. & REINISCH C.L. (1983) Amplification of granulopoiesis by T cell subpopulations. **Exp. Hematol.** 11:747

315 - BROXMEYER H.E., LU L. & BOGNACKI J. (1983) Transferrin derived from an OKT8 positive subpopulation of T lymphocytes suppress the production of granulocyte-macrophage colony-stimulatory factors from mitogen-activated T lymphocytes. **Blood** 62:37

316 - MORRIS T.C.M., VINCENT P.C., SUTHERLAND R. & HERSEY P. (1980) Inhibition of normal human granulopoiesis in vitro by non-B, non-T lymphocytes. **Brit. J. Haematol.** 45:541

317 - HANSSON M., BERAN M., ANDERSSON B. & KIESSLING R. (1982) Inhibition of in vitro granulopoiesis by autologous and allogeneic human NK cells. **J. Immunol.** 129:126

318 - SPITZER G. & VERMA D.S. (1982) Cells with Fc γ receptors from normal donors suppress granulocytic macrophage colony formation. **Blood** 60: 758

319 - TIMOMEN T., ORTALDO J.R. & HEBERMAN R. B. (1981) Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. **J. Exp. Med.** 153:569

320 - FERRARINI M., CADONI A., FRANZI A.T., GHIGLIOTTI C., LEPRINI A., ZICCA A. & GROSSI C.E. (1980) Ultrastructure and cytochemistry of human peripheral blood lymphocytes: similarities between the cells of the third population and T_G lymphocytes. **Eur. J. Immunol.** 10:562

321 - GROSSI C.E., CADONI A., ZICCA A., LEPRINI A. & FERRARINI M. (1982) Large granular lymphocytes in human peripheral blood: ultrastructural and cytochemical characterization of the granules. **Blood** 59:277

322 - PISTOIA V., GHIO R., NOCERA A., LEPRINI A., PERATA A. & FERRARINI M. (1985) Large granular lymphocytes have a promoting activity on human peripheral blood erythroid burst-forming units. **Blood** 65:464

323 - O'BRIEN T.K., KENDRA J.A., STEPHENS H.A.F., KNIGHT R.A. & BARRETT A.J. (1983) Recognition of marrow elements by natural killer cells: are NK cells involved in haemopoietic regulation. **Brit. J. Haematol.** 53:161

324 - PORZSOLT F. & HEIMPEL H. (1982) T-cell and NK-cell function in patients with preleukemia. **Blut** 45:243

325 - KNOX S.J., GREENBERG B.R., ANDERSON R.W. & ROSENBLATT L.S. (1983) Studies of T-lymphocytes in preleukemic disorders and acute nonlymphocytic leukemia: in vitro radiosensitivity, mitogenic responsiveness, colony formation and enumeration of lymphocytic subpopulations. **Blood** 61:449

326 - KASAHARA T., DJEU J.Y., DOUGHERTY S.F. & OPPENHEIM J.J. (1983) Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to produce multiple lymphokines: interleukin 2, interferon and colony stimulating factor. **J. Immunol.** 131:2379

327 - SPECK B., GLUCKMAN E., HAAK H.L. & VAN ROOD J.J. (1977) Treatment of aplastic anaemia by antilymphocyte globulin with and without allogeneic bone marrow transfusion. **Lancet** ii: 1145

328 - MILLER W.J., BRANDA R.F., FLYNN P.J., HOWE R.B., RAMSAY N.K.C., CONDIE R.M. & JACOB H.S. (1983) Antithymocyte globulin treatment of severe aplastic anaemia. **Brit. J. Haematol.** 55: 17

329 - CHAMPLIN R., HO W. & GALE R.P. (1983) Antithymocyte globulin treatment in patients with aplastic anemia: a prospective randomized trial. **N. Engl. J. Med.** 308: 113

330 - CAMITTA B., O'REILLY R.J., SENSENBRENNER L., RAPPEPORT J., CHAMPLIN R., DONEY K., AUGUST C., HOFFMAN R.G., KIRKPATRICK D., STUART R., SANTOS G., PARKMAN R., GALE R.P., STORB R. & NATHAN D. (1983) Antithoracic duct lymphocyte globulin therapy of severe aplastic anemia. **Blood** 62: 883

331 - RAEFSKY E.L., GASCON P., GRATWOHL A., SPECK B. & YOUNG N.S. (1986) Biological and immunological characterization of ATG and ALG. **Blood** 68: 712

332 - PALLESEN G. & PLESNER T. (1987) Congress letter: The Third International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens with an up-to-date overview of the CD nomenclature. **Leukemia** 1: 231

333 - MORGAN D.A., RUSCETTI F.W. & GALLO P.C. (1976) Growth of thymus-derived lymphocytes from normal human bone marrow. **Science** 193: 1007

334 - MIER J.W. & GALLO R.C. (1980) Purification and some properties of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte conditioned media. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77: 6134

335 - DONEY K., MARTIN P., STORB R., WHITEHEAD J., SMITH A., HANSEN J.A., APPELBAUM F., BUCKNER C.D. & THOMAS E.D. (1985) A randomized trial of antihuman thymocyte globulin versus murine monoclonal antihuman T-cell antibodies as immunosuppressive therapy for aplastic anemia. **Exp. Hematol.** 13: 520

336 - GUIMARÃES J.E.T.E. (1987) Anticorpos monoclonais no diagnóstico e tratamento. **Arquivos de Medicina** 1:113

337 - DORR A.D. & MOLONEY W.C. (1959) Acquired pseudo-Pelger anomaly of granulocytic leukocytes. **N. Engl. J. Med.** 261: 742

338 - LINMAN J.W. & BAGBY G.C.Jr. (1976) The preleukemic syndrome: clinical and laboratory features, natural course and management. **Blood Cells** 2: 11

339 - LINMAN J.W. & BAGBY G.C.Jr (1978) The preleukemic syndrome (hemopoietic dysplasia). **Cancer** 42: 854

340 - MARTIN S., BALDOCK S.C., GHONEIM A.T.M. & CHILD J.A. (1983) Defective neutrophil function and microbicidal mechanisms in myelodysplastic disorders. **J. Clin. Path.** 36: 1120

341 - NOWELL P.C. & HUNGERFORD D.A. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science** 132:1197

342 - NOWELL P.C. & HUNGERFORD D.A. (1961) Chromosome studies in leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. **J. Natl. Cancer Inst.** 27: 1013

343 - KOEFFLER H.P. (1983) Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implications. **Blood** 62: 709

344 - PIERRE R.V. (1975) Cytogenetic studies in preleukemia: studies before and after transition to acute leukemia in 17 subjects. **Blood Cells** 1: 163

345 - SANDBERG A.A. (1980) **The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia.** Elsevier/North Holland

346 - ROWLEY J.D. (1980) Ph1-positive leukaemia, including chronic myelogenous leukaemia. **Clinics in Haematology** 9: 55

347 - KILLMAN S.A., CRONKITE E.P., ROBERTSON J.S., FLIEDNER T.M. & BOND U.P. (1963) Estimation of phases of the life cycle of leukemic cells from labelling in human beings in vivo with tritiated thymidine. **Lab. Invest.** 12: 671

348 - ARMITAGE J.O., DICK F.R., NEEDLEMAN S.W. & BURNS C.P. (1981) Effect of chemotherapy for the dysmyelopoietic syndrome. **Cancer Treatm. Reports** 65: 601

349 - FRANCIS G.E. & HOFFBRAND A.V. (1985) The myelodysplastic syndromes and preleukaemia. In **Recent Advances in Haematology** (Ed. Hoffbrand A.V.), pp. 239-267. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone

350 - LUCAS D.L., WEBSTER H.K. & WRIGHT D.G. (1983) Purine metabolism in myeloid precursor cells during maturation: studies with the HL60 cell line. **J. Clin. Invest.** 72: 1889

351 - JACKSON R.C. & WEBER G. (1975) IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy. **Nature** 256: 331

352 - REEM G.H. & FRIEND C. (1975) Purine metabolism in murine virus-induced erythroleukemia cells during differentiation in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 72: 1630

353 - MANNE V., BAKESI E. & KUNG H.-F. (1985) Ha-ras proteins exhibit GTPase activity: point mutations that activate Ha-ras gene products result in decreased GTPase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82: 376

354 - TODA T., UNO I., ISHIKAWA T., POWERS S., KATAOKA T., BROEK D., CAMERON S., BROACH J., MATSUMOTO K. & WIGLER M. (1985) In yeast ras proteins are controlling elements of adenylate cyclase. **Cell** 40: 27

355 - WESTIN E.H., WONG-STAAL F., GELMANN E.P., DALLA-FAVERA R., PAPAS T.S., LAUTENBERG J.A., EVA A., REDDY E.P., TRONICK S., AARONSON S. & GALLO R. (1982) Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79: 2490

356 - WESTIN E.H., GALLO R.C., ARYA S.K., EVA A., SOUZA L.M., BALUDA M.A., AARONSON S. & WONG-STAAL F (1982) Differential expression of the AMV gene in human hematopoietic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79: 2194

357 - GONDA T.J. & METCALF D. (1984) Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukemia. **Nature** 310: 249

358 - FRANCHINI G. & GALLO R.C. (1985) Viruses, onc genes and leukemia. In **Recent Advances in Haematology** (Ed. Hoffbrand A.V.), pp. 221-237. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone

359 - NIEDEL J., KUHN L. & VANDENBARK G. (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80: 36

360 - TERADA M., NUDEL U., FIBACH E., RIFKIND R.A. & MARKS P.A. (1978) Changes in DNA associated with induction of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide in murine erythroleukemia cells. **Cancer Res.** 38: 835

361 - REBOULLEAU C.P. & SHAPIRO H.S. (1983) Chemical inducers of differentiation cause conformational changes in the chromatin and deoxyribonucleic acid of murine erythroleukemia cells. **Biochemistry** 22: 4512

362 - CREUSOT F., ACS G. & CHRISTMAN J.K. (1982) Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. **J. Biol. Chem.** 257: 2041

363 - CHRISTMAN J.K., MENDELSOHN N., HERZOG D. & SCHNEIDERMAN N. (1983) Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). **Cancer Res.** 43: 763

364 - PINTO A., ATTADIA V., FUSCO A., FERRARA F., SPADA O.A. & DI FIORE P.P. (1984) 5-aza-2'-deoxycytidine induces terminal differentiation of leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemias. **Blood** 64:922

365 - COX R. & IRVING C.C. (1977) Inhibition of DNA methylation by S-adenosylethionine with the production of methyl-deficient DNA in regenerating rat liver. **Cancer Res.** 37:222

366 - VON DER AHE D., JANICH S., SCHEIDEREIT C., RENKAWITZ R., SCHUTZ G. & BEATO M. (1985) Glucocorticoid and progesterone receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters. **Nature** 313:706

367 - LAPEYRE J.-N. & BEKHOR I. (1974) Effects of 5-bromo-2'-deoxyuridine and dimethylsulfoxide on properties and structure of chromatin. **J. Molec. Biol.** 89:137

368 - KOEFFLER H.P., YEN J. & CARLSON J. (1983) The study of human myeloid differentiation using bromodeoxyuridine (BrdU). **J. Cell. Physiol.** 116:111

369 - BEATO M. (1984) Modulation of gene expression through DNA-binding proteins. Is there a regulatory code? **Haematology and Blood Transfusion**, Vol. 29, **Modern Trends in Human Leukemia VI** (Eds. Neth, Gallo, Greaves & Janka). Springer-Verlag

370 - KOEFFLER H.P. & GOLDE D.W. (1978) Cellular maturation in human preleukemia. **Blood** 52:355

371 - ELSTNER E., SCHULTZE E., IHLE R., SCHUTT M. & STOBE H. (1983) Proliferation and maturation of haemopoietic cells from patients with preleukaemia and aplastic anaemia in agar and diffusion chamber cultures. **Haematology and Blood Transfusion**, Vol. 28, **Modern Trends in Human Leukemia** (Eds. Neth, Gallo, Greaves, Moore & Winkler). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag

372 - BYNOE A.G., SCOTT C.S., FORD P. & ROBERTS B.E. (1983) Decreased T helper cells in the myelodysplastic syndromes. **Brit. J. Haematol.** 54: 97

373 - WAXMAN S. & SCHREIBER C. (1983) In vitro induction of differentiation of bone marrow by chemotherapeutic agents in myeloproliferative disorders. **Blood** 62 (Suppl. 1): 156a

374 - BREITMAN T., COLLINS S. & KEENE B. (1981) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. **Blood** 57:1000

375 - GALLO R.C., BREITMAN T.R. & RUSCETTI F.W. (1982) Proliferation and differentiation of human myeloid leukemia cell lines in vitro. In **Maturation Factors in Cancer** (Ed. Moore M.A.S.) New York: Raven Press

376 - GOLD E.J., MERTELSMANN R.H., ITRI L.M., GEE T., ARLIN Z., KEMI S., CLARKSON B. & MOORE M.A.S. (1983) Phase I clinical trial of 13-cis-retinoic acid in myelodysplastic syndromes. **Cancer Treatm. Reports** 67:981

377 - BESA E.C., GRALNICK J., ITRI L. & NOWELL P.C. (1983) Complete hematologic and cytogenetic remission in a patient with dysmyelopoietic syndrome treated with 13-cis-retinoic acid. **Blood** 62 (Suppl. 1): 199a

378 - OLSSON I.L., BREITMAN T.R., SARNGADHARAN M.G. & GALLO R. C. (1983) Mechanisms for induction of differentiation in the human promyelocytic cell line HL-60. **Haematology and Blood Transfusion**, Vol. 28, **Modern Trends in Human Leukemia** V (Eds. Neth, Gallo, Greaves, Moore & Winkler). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag

379 - OLSSON I., BREITMAN T.R. & GALLO R.C. (1982) Priming of human myeloid leukemia cell lines (HL-60 and U-937) with retinoic acid for differentiation effects of cyclic AMP-inducing agents and a T-lymphocyte derived differentiation factor. **Cancer Res.** 42:3928

380 - DOUER D. & KOEFFLER H.P. (1982) Retinoic acid enhances colony-stimulating factor induced clonal growth of normal human myeloid progenitor cells in vitro. **Exp. Cell Res.** 138:193

381 - DOUER D. & KOEFFLER H.P. (1982) Retinoic acid enhances growth of human early erythroid progenitor cells in vitro. **J. Clin. Invest.** 69:1039

382 - DOUER D. & KOEFFLER H.P. (1982) Retinoic acid inhibition of the clonal growth of human myeloid leukemia cells. **J. Clin. Invest.** 69:277

383 - STRICKLAND S. & MAHDAVI V. (1980) The induction of differentiation in teratocarcinoma cells by retinoic acid. **Cell** 15:393

384 - LOTAN R. (1980) Effects of vitamin A and its analogues (retinoids) on normal and neoplastic cells. **Biochim. Biophys. Acta** 605:33

385 - TANAKA M., LEVY J., TERADA M., BROSLOW R., RIFKIND R.A. & MARKS P.A. (1975) Induction of erythroid differentiation in murine virus infected erythroleukemia cells by highly polar compounds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 72:1003

386 - YEN A. & CHIAO J.W. (1983) Control of differentiation during proliferation. I. Monocytic differentiation of HL60 promyelocytes. **Exp. Cell Res.** 146:87

387 - YEN A., REECE S.L. & ALBRIGHT K.L. (1985) Control of cell differentiation during proliferation. II. Myeloid differentiation and cell cycle arrest of HL-60 promyelocytes preceded by nuclear structural changes. **Leukemia Res.** 9:51

388 - SACHS L. (1978) The differentiation of myeloid leukaemia cells: new possibilities for therapy. **Brit. J. Haematol.** 40:509

389 - BACCARANI M. & TURA S. (1979) Differentiation of myeloid leukaemia cells: new possibilities for therapy. **Brit. J. Haematol.** 42:485

390 - HOUSSET M., DANIEL M.-T. & DEGOS L. (1982) Small doses of ARA-C in the treatment of acute myeloid leukaemia: differentiation of myeloid leukaemia cells? **Brit. J. Haematol.** 51:125

391 - BACCARANI M., ZACCARIA A., BANDINI G., GAVAZZINI G., FANIN R. & TURA S. (1983) Low dose arabinosyl cytosine for treatment of myelodysplastic syndromes and subacute myeloid leukemia. **Leukemia Res.** 7:539

392 - MUFTI G.J., OSCIER D.G., HAMBLIN T.J. & BELL A.J. (1983) Low doses of cytarabine in the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.** 309:1653

393 - CASTAIGNE S., DANIEL M.-T., TILLY H., HERAIT P. & DEGOS L. (1983) Does treatment with ARA-C in low dosage cause differentiation of leukemic cells? **Blood** 62:85

394 - TRICOT G., DE BOCK R., DEKKER A.W., BOOGAERTS M.A., PEETERMANS M., PUNT K. & VERWILGHEN R.L. (1984) Low dose cytosine arabinoside (ARA-C) in myelodysplastic syndromes. **Brit. J. Haematol.** 58:231

395 - FLYNN P.J., MILLER W.J., WEISDORF D.J., ARTHUR D.C., BRUNNING R. & BRANDA R.F. (1983) Retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia: in vitro and in vivo observations. **Blood** 62:1211

396 - SEVERINGHAUS E.L. (1965) The Vitamins. In Drill' s **Pharmacology in Medicine** (Ed. Joseph R. Di Palma). New York, Toronto, Sidney, London: McGraw Hill Book Co.

397 - GALLAGHER J.C., JERBAK C.M., JEE W.S.S., JOHNSON K.A., DE LUCA H.F. & RIGGS B.L. (1982) 1,25-dihydroxyvitamin D3: short and long-term effects on bone and calcium metabolism in patients with post menopausal osteoporosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79:3325

398 - FRANCIS G.E., MUFTI G.J., KNOWLES S.M., BERNEY J.J., GUIMARAES J.E.T., SECKER-WALKER L.M. & HAMBLIN T.J. (1986) Differentiation induction in myelodyplasia and acute myeloid leukaemia: use of synergistic drug combinations. **Leukemia Res.** (in press)

399 - BROXMEYER H.E., GROSSBARD E., JACOBSEN N. & MOORE M.A.S. (1979) Persistence of leukemia inhibitory activity during remission of acute leukemia. **N. Engl. J. Med.** 301:346

400 - DEZZA L., CAZZOLA M., PIACIBELLO W., AROSIO P. & AGLIETTA M. (1986) Effect of acidic and basic isoferritins on in vitro growth of human granulocyte-monocyte progenitors. **Blood** 67:789

401 - BROXMEYER H.E., JULIANO L., WAHEED A. & SHADDUCK R.K. (1985) Release from mouse macrophages of acidic isoferritins that suppress hematopoietic progenitor cells is induced by purified L cell colony stimulating factor and suppressed by human lactoferrin. **J. Immunol.** 135:3224

402 - KLAUSNER R.D., VAN RENSWOUDE J., ASHWELL G., KEMPF C., SCHECHTER A.N., DEAN A. & BRIDGES K.R. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K562 cells. **J. Biol. Chem.** 258:4715

403 - BOMFORD A., YOUNG S.P., KAYHAN N.-A. & WILLIAMS R. (1983) Uptake and release of transferrin and iron by mitogen-stimulated human lymphocytes. **Brit. J. Haematol.** 55:93

404 - SEPHTON-SMITH R. (1962) Iron excretion in thalassemia major after administration of chelating agents. **Brit. Med. J.** ii:1577

405 - MODELL C.B. & BECK J. (1974) Long term desferrioxamine therapy in thalassemia. **Annals N.Y. Acad. Sci.** 232:201

406 - BARRY M., FLYNN D.N., LETSKY E.A. & RISDON R.A. (1974) Long term chelation therapy in thalassemia major: effect on liver iron concentration, liver histology and clinical progress. **Brit. Med. J.** i:16

407 - CONSTANTOULAKIS M., ECONOMIDOU J., KARAGIORGA M., KATSANTONI A & GYFTAKI E. (1974) Combined long-term treatment of hemosiderosis with desferrioxamine and DTPA in homozygous β-thalassemia. **Annals N.Y. Acad. Sci.** 232:193

408 - HUSSAIN M.A.M., GREEN N., FLYNN D.M., HUSSEIN S. & HOFFBRAND A. V. (1976) Subcutaneous infusion and intramuscular injection of desferrioxamine in patients with transfusional iron overload. **Lancet** ii: 1278

409 - PROPPER R.D., SHURIN S.B. & NATHAN D.G. (1976) Reassessment of the use of desferrioxamine B in iron overload. **N. Engl. J. Med.** 294: 1421

410 - HUSSAIN M.A.M., FLYNN D.M., GREEN N. & HOFFBRAND A.V. (1977) Effect of dose, time and ascorbate on iron excretion after subcutaneous desferrioxamine. **Lancet** i: 977

411 - PROPPER R.D., COOPER B., RUFO R.R., NIENHUIS A.W., ANDERSON W.F., BUNN H.F, ROSENTHAL A. & NATHAN D.G. (1977) Continous subcutaneous administration of deferoxamine in patients with iron overload. **N. Engl. J. Med.** 297: 418

412 - HOFFBRAND A.V., GORMAN A., LAULICHT M., GARIDI M., ECONOMIDOU J., GEORGIPOULOU P., HUSSAIN M.A.M. & FLYNN D.M. (1979) Improvement in iron status and liver function in patients with transfusional iron overload with long-term subcutaneous desferrioxamine. **Lancet** i: 947

413 - MENDELSOHN J., TROWBRIDGE I. & CASTAGNOLA J. (1983) Inhibition of human lymphocyte proliferation by monoclonal antibody to transferrin receptor. **Blood** 62: 821

414 - PICKART L. & THALER M.M. (1980) Growth-modulating tripeptide (glycylhistidyllysine): association with copper and iron in plasma and stimulation of adhesiveness and growth of hepatoma cells in culture by tripeptide-metal ion complexes. **J. Cell. Physiol.** 102: 129

415 - FERNANDEZ-POL J.A. (1978) Isolation and characterization of a siderophore-like growth factor from mutants of SV40-transformed cells adapted to picolinic acid. **Cell** 14: 489

416 - HOFFBRAND A.V., GANESHAGURU K., HOOTON J.W.L. & TATTERSALL M.H.N. (1976) Effect of iron deficiency and desferrioxamine on DNA synthesis in human cells. **Brit. J. Haematol.** 33: 517

417 - GANESHAGURU K., HOFFBRAND A.V., GRADY R.W. & CERAMI A. (1980) Effect of various iron chelating agents on DNA synthesis in human cells. **Biochem. Pharmacol.** 29: 1275

418 - LEDERMAN H.M., COHEN A., LEE J.W.W., FREEDMAN M.H. & GELFAND E. W. (1984) Deferoxamine: a reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. **Blood** 64: 748

419 - FOA P., MAIOLO A.T., LOMBARDI L., VILLA L. & POLLI E.E. (1986) Inhibition of proliferation of human leukemic cell populations by deferoxamine. **Scand. J. Haematol.** 36: 107

420 - REICHARD P. (1967) The biosynthesis of deoxyribose. **Ciba Lectures in Biochemistry.** New York: John Wiley

421 - ADAMS R.L.P., BERRYMAN S. & THOMSON A. (1971) Deoxyribonucleoside triphosphate pools in synchronized and drug-inhibited L929 cells. **Biochim. Biophys. Acta** 240: 455

422 - YEH Y.-C. & TESSMAN I. (1978) Differential effect of hydroxyurea on a ribonucleotide reductase system. **J. Biol. Chem.** 253: 1323

423 - THELANDER L. & REICHARD P. (1979) Reduction of ribonucleotides. **Annu. Rev. Biochem.** 48: 133

424 - PARDEE A.B., DUBROW R., HAMLIN J.L. & KLETZIEN R.L. (1978) Animal cell cycle. **Annu. Rev. Biochem.** 47: 715

425 - AISENBERG A.C., BLOCH K.J. & WILKES B.M. (1981) Malignant lymphoma with dual B and T cell markers. **J. Exp. Med.** 154: 1709

426 - BRADSTOCK K.F., HOFFBRAND A.V., GANESHAGURU K., LLEWELLIN P., PATTERSON K., WONKE B., PRENTICE H.G., BENNETT M., PIZZOLO G., BOLLUM F.J. & JANOSSY G. (1981) Terminal deoxynucleotidyl transferase expression in acute non-lymphoid leukaemia: an analysis by immunofluorescence. **Brit. J. Haematol.** 47: 133

427 - SCHROFF R.W. & FOON K.A. (1982) Heterogeneity in a lymphoid tumor: coexpression of T and B surface markers. **Blood** 60: 373

428 - HA K., MINDEN M., HOZUMI N. & GELFAND E.W. (1984) Immunoglobulin-chain gene rearrangement in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. **J. Clin. Invest.** 73: 1232

429 - CHAN L.C. & GREAVES M.F. (1984) Acute leukaemia with mixed lymphoid and myeloid phenotype. **Brit. J. Haematol.** 58: 203

430 - PALUMBO A., MINOWADA J., ERIKSON J., CROCE C.M. & ROVERA G. (1984) Lineage infidelity of a human myelogenous leukemia cell line. **Blood** 64: 1059

431 - HA K., MINDEN M., HOZUMI N. & GELFAND E.W. (1984) Immunoglobulin gene rearrangement in acute myelogenous leukemia. **Cancer Res.** 44: 4658

432 - MIRRO J., ANTOUN G.R., ZIPF T.F., MELVIN S. & STASS S. (1985) The E rosette-associated antigen of T cells can be identified on blasts from patients with acute myeloblastic leukemia. **Blood** 65: 363

433 - NEAME P.B., SOAMBOONSRUP P., BROWMAN G., BARR R.D., SAEED N., CHAN B., PAI M., BENGER A., WILSON W.E.C., WALKER I.R. & MCBRIDE J.A. (1985) Simultaneous or sequential expression of lymphoid and myeloid phenotypes in acute leukemia. **Blood** 65: 142

434 - MARIE J.P., IZAGUIRRE C.A., CIVIN C.L., MIRRO J. & MCCULLOCH E.A. (1981) The presence within single K562 cells of erythropoietic and granulopoietic differentiation markers. **Blood** 58: 708

435 - SMITH L.J., CURTIS J.E., MESSNER H.A., SENN J.S., FURTHMAYR H. & MCCULLOCH E.A. (1983) Lineage infidelity in acute leukemia. **Blood** 61: 1138

436 - FRANCIS G.E., KHAN Z., GRAY D.A., WING M.A., BERNEY J.J., GUIMARAES J.E.T.E. & HOFFBRAND A.V. (1984) Contrasting effects of ADP-ribosyl transferase inhibitors on monocytic differentiation of leukaemic and normal granulocyte-macrophage progenitors. **Exp. Hematol.** 12: 375

437 - GREAVES M.F., CHAN L.C., FURLEY A.J.W., WATT S.M. & MOLGAARD H.V. (1986) Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. **Blood** 67: 1

438 - RUTHERFORD T.R., CLEGG J.B. & WEATHERALL D.J. (1979) K562 human leukaemic cells synthesize embryonic haemoglobin in response to haemin. **Nature** 280: 164

439 - CIOE L., MCNAB A., HUBBEL H.R., MEO P., CURTIS P. & ROVERA G. (1981) Differential expression of the globin genes in human leukemia K562 (s) cells induced to differentiate by hemin or butyric acid. **Cancer Res.** 41: 237

440 - ANDERSSON L.C., JOKINEN M. & GAHMBERG C.G. (1979) Induction of erythroid differentiation in the human leukemia cell line K562. **Nature** 278: 364

441 - PLATT O.S., ORKIN S.H., DOVER G., BEARDSLEY G.P., MILLER B. & NATHAN D.G. (1984) Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **J. Clin. Invest.** 74: 652

442 - LETVIN N.L., LINCH D.C., BEARDSLEY G.P., MCINTYRE K.W. & NATHAN D.G. (1984) Augmentation of fetal hemoglobin production in anemic monkeys by hydroxyurea. **N. Engl. J. Med.** 310: 869

443 - DOVER G.J., HUMPHRIES R.K., MOORE J.G., LEY T.J., YOUNG N.S., CHARACHE S. & NIENHUIS A.W. (1986) Hydroxyurea induction of hemoglobin F production in sickle cell disease: relationship between cytotoxicity and F cell production. **Blood** 67: 735

444 - METZ-BOUTIQUE M.H., JOLLES J., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J. & JOLLES P. (1978) Structural studies concerning human lactotransferrin: its relatedness with human serum transferrin and evidence for internal homology. **Biochimie** 60: 557

445 - JACOBS A. (1982) Disorders of iron metabolism. In **Recent Advances in Haematology** (Ed. Hoffbrand A.V.), pp. 1-24. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone

446 - BAGBY G.C., RIGAS V.D., BENNETT R.M., VANDENBARK A.A. & GAREWAL H.S. (1981) Interaction of lactoferrin, monocytes and T-lymphocyte subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis in vitro. **J. Clin. Invest.** 68: 56

447 - BAGBY G.C. & BENNETT R.M. (1982) Feedback regulation of granulopoiesis: polymerization of lactoferrin abrogates its ability to inhibit CSA production. **Blood** 60: 108

448 - BULLEN J.J., ROGERS H.J. & LEIGH L. (1972) Iron-binding proteins in milk and resistance to Escherichia coli infection in infants. **Brit. Med. J.** i: 69

449 - BIRGENS H.S., HANSEN N.E., KARLE H. & KRISTENSEN L.O. (1983) Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. **Brit. J. Haematol.** 54: 383

450 - STEINMANN G., BROXMEYER H.E., DE HARVEN E. & MOORE M.A.S. (1982) Immuno-electron microscopic tracing of lactoferrin, a regulator of myelopoiesis, into a subpopulation of human peripheral blood monocytes. **Brit. J. Haematol.** 50: 75

451 - VAN SNICK J.L. & MASSON P.L. (1976) The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal macrophages. **J. Exp. Med.** 144: 1568

452 - VAN SNICK J.L., MARKOWETZ B. & MASSON P.L. (1977) The ingestion and digestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfer of its iron into ferritin. **J. Exp. Med.** 146: 817

453 - BROXMEYER H.E., GENTILE P., COOPER S., LU L., JULIANO L., PIACIBELLO W., MEYERS P.A. & CAVANNA F. (1984) Functional activities of acidic isoferritins and lactoferrin in vitro and in vivo. **Blood Cells** 10: 397

454 - BOMFORD A.B. & MUNRO H.N. (1980) Biosynthesis of ferritin and isoferritins. In **Iron in Biochemistry and Medicine II** (Eds. Jacobs A. & Worwood M.), pp. 173-199. London, New York: Academic Press

455 - WAGSTAFF M., WORWOOD M. & JACOBS A. (1978) Properties of human tissue isoferritins. **Biochem. J.** 173: 969

456 - BRYCE C.F. & CRICHTON R.R. (1973) The catalytic activity of horse spleen apoferritin. Preliminary kinetic studies and the effect of chemical modification. **Biochem. J.** 133: 301

457 - SIRIVECH S., FRIEDEN E. & OSAKI S. (1974) The release of iron from horse spleen ferritin by reduced flavins. **Biochem. J.** 143: 311

458 - JONES T., SPENCER R. & WALSH C. (1978) Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavins and dihydroflavin analogues. **Biochemistry** 17:4011

459 - DRYSDALE J.W. & SHAFRITZ D.A. (1975) In vitro stimulation of apoferritin synthesis by iron. **Biochim. Biophys. Acta** 383:97

460 - ZAHRINGER J., BALIGA B.S. & MUNRO H.N. (1976) Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 73:857

461 - CAIRO G., SCHIAFFONATI L., BARDELLA L., LEVIS S. & AROSIO P. (1984) Mechanisms of iron-stimulated synthesis of isoferritins in HeLa cells. **Proceedings of the Iron Club Meeting**, Rennes (France)

462 - WHITE G.P., WORWOOD M., PARRY D. & JACOBS A. (1974) Ferritin synthesis in normal and leukaemic leucocytes. **Nature** 250:584

463 - SARCIONE E.J., SMALLEY J.R., LEMA M.J. & STUTZMAN L. (1977) Increased ferritin synthesis and release by Hodgkin' s disease peripheral blood lymphocytes. **Int. J. Cancer** 20:339

464 - HAZARD J.T. & DRYSDALE J.W. (1977) Ferritinaemia in cancer. **Nature** 265:755

465 - MARCUS D.M. & ZINBERG N. (1975) Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay: results in normal individuals and patients with breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** 55:791

466 - MARCUS D.M. & ZINBERG N. (1974) Isolation of ferritin from human mammary and pancreatic carcinomas by means of antibody immunoadsorbents. **Arch. Biochem. Biophysics** 162:493

467 - ALPERT E. (1975) Characterization and subunit analysis of ferritin isolated from normal and malignant human liver. **Cancer Res.** 35:1505

468 - JONES P.A.E., MILLER F.M., WORWOOD M. & JACOBS A. (1973) Ferritinaemia in leukaemia and Hodgkin' s disease. **Brit. J. Cancer** 27:212

469 - CRAGG S.J., JACOBS A., PARRY D.H., WAGSTAFF M. & WORWOOD M. (1977) Isoferritins in acute leukaemia. **Brit. J. Cancer** 35:635

470 - MATZNER Y., KONIJN A.M. & HERSHKO C. (1980) Serum ferritin in hematologic malignancies. **Am. J. Hematol.** 9:13

471 - SALA G., WORWOOD M. & JACOBS A. (1986) The effect of isoferritins on granulopoiesis. **Blood** 67:436

472 - JOHNSON C.S., MARCELETTI J., LONGLEY C. & FURMANSKY P. (1982) Inhibition of normal erythropoiesis in mice with Friend virus induced erythroleukemia. **Exp. Hematol.** 10:743

473 - MOORE R.N., JOSHI J.G., DEANA D.G., PITRUZELLO F.J., HOROHOV D.W. & ROUSE B.T. (1986) Characterization of a two-signal-dependent, Ia+ mononuclear phagocyte progenitor subpopulation that is sensitive to inhibition by ferritin. **J. Immunol.** 136:1605

474 - MOROZ C., GILER S., KUPFER B. & URCA I. (1977) Lymphocytes bearing surface ferritin in patients with Hodgkin' s disease and breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 296:1172

475 - MATZNER Y., HERSHKO C., POLLIACK A., KONIJN A.M. & ISAK G. (1979) Supressive effect of ferritin on in vitro lymphocyte function. **Brit. J. Haematol.** 42:345

476 - MATZNER Y., KONIJN A.M., SHLOMAI Z. & BEN-BASSAT H. (1985) Differential effect of isolated placental isoferritins on in vitro T-lymphocyte function. **Brit. J. Haematol.** 59:443

477 - HANCOCK B.W., BRUCE L., MAY K. & RICHMOND J. (1979) Ferritin, a sensitizing substance in the leucocyte migration inhibition test in patients with malignant lymphoma. **Brit. J. Haematol.** 43:223

478 - KONIJN A. M., FIBACH E. & RACHMILEWITZ E. A. (1984) Changes in cellular ferritin content during myeloid differentiation of human leukemia cell lines. **Proceedings of the Iron Club Meeting,** Rennes (France)

479 - DORNER M.H., SILVERSTONE A., NISHYA K., DE SOSTOA A., MUNN G. & DE SOUSA M. (1980) Ferritin synthesis by human T lymphocytes. **Science** 209:1019

480 - DORNER M.H., SILVERSTONE A.E., DE SOSTOA A., MUNN G. & DE SOUSA M. (1983) Relative subunit composition of the ferritin synthesized by selected human lymphomyeloid cell populations. **Exp. Hematol.** 11:866

481 - POLLACK S. & CAMPANA T. (1981) Immature red cells have ferritin receptors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 100:1667

482 - MACK U., POWELL L.W. & HALLIDAY J.W. (1983) Detection and isolation of a hepatic membrane receptor for ferritin. **J. Biol. Chem.** 258:4672

483 - BLIGHT G.D. & MORGAN E.H. (1983) Ferritin and iron uptake by reticulocytes. **Brit. J. Haematol.** 55:59

484 - MONETTE F.C. & HOLDEN S.A. (1982) Hemin enhances the in vitro growth of primitive erythroid progenitor cells. **Blood** 60:527

485 - LU L. & BROXMEYER H.E. (1983) The selective enhancing influence of hemin and products of human erythrocytes on colony formation by human multipotential (CFU-GEMM) and erythroid (BFU-E) progenitor cells in vitro. **Exp. Hematol.** 11:721

486 - ROTHMANN J., HERTOGS C.F, MALIK Z. & PLUZNIK D.H. (1983) Hemin stimulating effect on colony formation of leukemic and bone marrow cells. **Exp. Hematol.** 11:147

487 - MONETTE F.C., SIGOUNAS G. & TARPY R.E. (1984) Growth requirements and properties of pluripotent stem cells assayed in vitro. **Exp. Hematol.** 12: 457

488 - ROSS J. & SAUTNER D. (1976) Induction of globin mRNA accumulation by hemin in cultured erythroleukemic cells. **Cell** 8: 513

489 - AISEN P. (1974) The role of transferrin in iron transport. **Brit. J. Haematol.** 26: 159

490 - GATTER K.C., BROWN G., TROWBRIDGE I.S., WOOLSTON R.-E. & MASON D.Y. (1983) Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. **J. Clin. Path.** 36: 539

491 - LARRICK J.W. & CRESSWELL P. (1979) Transferrin receptors on human B and T lymphoblastoid cell lines. **Biochim. Biophys. Acta** 583: 483

492 - GODING J.W. & BURNS G.F. (1981) Monoclonal antibody OKT9 recognizes the receptor for transferrin on human acute lymphocytic leukaemia cells. **J. Immunol.** 127: 1256

493 - NECKERS L.M. & COSSMAN J. (1983) Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80: 3494

494 - PAUZA C.D., BLEIL J.D. & LENNOX E.S. (1984) The control of transferrin receptor synthesis in mitogen-stimulated human lymphocytes. **Exp. Cell Res.** 154: 510

495 - NECKERS L.M., YENOKIDA G. & JAMES S.P. (1984) The role of transferrin receptor in human B lymphocyte activation. **J. Immunol.** 133: 2437

496 - BROWN N.C., ELIASSON R., REICHARD P. & THELANDER L. (1969) Spectrum and iron content of protein B2 from ribonucleoside diphosphate reductase. **Eur. J. Biochem.** 9: 512

497 - REICHARD P. (1968) The biosynthesis of deoxyribonucleotides. **Eur. J. Biochem.** 3: 259

498 - REICHARD P. (1973) Control of deoxyribonucleotide synthesis in vitro and in vivo. **Adv. Enz. Reg.** 10: 3

499 - ELFORD H.L. (1973) Functional regulation of mammalian ribonucleotide reductase. **Adv. Enz. Reg.** 10: 19

500 - VON DOBELN U. & REICHARD P. (1976) Binding of substrates to Escherichia coli ribonucleotide reductase. **J. Biol. Chem.** 251: 3616

501 - THELANDER L., ERIKSSON S. & AKERMAN M. (1980) Ribonucleotide reductase from calf thymus. Separation of the enzyme into two nonidentical subunits, proteins M1 and M2. **J. Biol. Chem.** 255: 7426

502 - SJOBERG B.-M., REICHARD P., GRASLUND A. & EHRENBERG A. (1978) The tyrosine free radical in ribonucleotide reductase from Escherichia coli. **J. Biol. Chem.** 253: 6863

503 - GRASLUND A., EHRENBERG A. & THELANDER L. (1982) Characterization of the free radical of mammalian ribonucleotide reductase. **J. Biol. Chem.** 257: 5711

504 - THELANDER L., GRASLUND A. & THELANDER M. (1983) Continual presence of oxygen and iron required for mammalian ribonucleotide reduction: possible regulation mechanism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 110: 859

505 - KJOLLER LARSEN I., SJOBERG B.-M. & THELANDER L. (1982) Characterization of the active site of ribonucleotide reductase of Escherichia coli, bacteriophage T4 and mammalian cells by inhibition studies with hydroxyurea analogues. **Eur. J. Biochem.** 125: 75

506 - THELANDER L. & GRASLUND A. (1983) Mechanism of inhibition of mammalian ribonucleotide reductase by the iron chelate of 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone: destruction of the tyrosine free radical of the enzyme in an oxigen-requiring reaction. **J. Biol. Chem.** 258:4063

507 - GOUBIN G., GOLDMAN D.S., LUCE J., NEIMAN P.E. & COOPER G.M. (1983) Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA. **Nature** 302:114

508 - EKBLOM P., THESLEFF I., SAXEN L., MIETTINEN A. & TIMPL R. (1983) Transferrin as a fetal growth factor: acquisition of responsiveness related to embryonic induction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80:2651

509 - BROWN J.P., HEWICK R.M., HELLSTROM I., HELLSTROM K.E., DOOLITTLE R.F. & DREYER W.J. (1982) Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin. **Nature** 296:171

510 - DE SOUSA M., DA SILVA B.M., DORNER M., MUNN G., NISHIYA K., GRADY R.W. & SILVERSTONE A. (1982) Iron and the lymphomyeloid system: rationale for considering iron as a target of "immune surveillance". In **The Biochemistry and Physiology of Iron** (Eds. Saltman P. & Hegenauer J.), pp. 687-698. Elsevier/North Holland Inc.

511 - ELFORD H.L., FREESE M., PASSAMANI E. & MORRIS H.P. (1970) Ribonucleotide reductase and cell proliferation. I. Variations of ribonucleotide reductase activity with tumor growth rate in series of rat hepatomas. **J. Biol. Chem.** 245:5228

512 - WADDELL D. & ULLMAN B. (1983) Characterization of a cultured human T-cell line with genetically altered ribonucleotide reductase activity: model for immunodeficiency. **J. Biol. Chem.** 258:4226

513 - ERIKSSON S., GUDAS L.J., ULLMAN B., CLIFT S.M. & MARTIN D.W. (1981) DeoxyATP-resistant ribonucleotide reductase of mutant mouse lymphoma cells: evidence for heterozygosity for the protein M1 subunits. **J. Biol. Chem.** 256:10184

514 - WEINBERG G., ULLMAN B. & MARTIN D.W. (1981) Mutator phenotypes in mammalian cell mutants with distinct biochemical defects and abnormal deoxyribonucleoside triphosphate pools. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78:2447

515 - ULLMAN B., GUDAS L.J., CARAS I.W., ERIKSSON S., WEINBERG G.L., WORMSTED M.A. & MARTIN D.W. (1981) Demonstration of normal and mutant protein M1 subunits of deoxyGTP-resistant ribonucleotide reductase from mutant mouse lymphoma cells. **J. Biol. Chem.** 256:10189

516 - LANGELIER Y., DECHAMPS M. & BUTTIN G. (1978) Analysis of dCMP deaminase and dCMP reductase levels in hamster cells infected by herpes simplex virus. **J. Virol.** 26:547

517 - MEUTH M., L' HEUREUX-HUARD N. & TRUDEL M. (1979) Characterization of a mutator gene in Chinese hamster ovary cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76:6505

518 - AKERBLOM L., EHRENBERG A., GRASLUND A., LANKINEN H., REICHARD P. & THELANDER L. (1981) Overproduction of the free radical of ribonucleotide reductase in hydroxyurea-resistant mouse fibroblast 3T6 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78:2159

519 - HUSZAR D. & BACCHETTI S. (1981) Partial purification and characterization of the ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus infection of mammalian cells. **J. Virol.** 37:580

520 - HUSZAR D. & BACCHETTI S. (1983) Is ribonucleotide reductase the transforming function of herpes simplex virus 2? **Nature** 302:76

521 - BERCH E.H., GLASER R., HEWETSON J. & O' CALLAGHAN D.J. (1978) Expression of altered ribonucleotide reductase activity associated with the replication of the Epstein-Barr virus. **Virology** 89:262

522 - DE ASUA L.J., CLINGAN D. & RUDLAND P.S. (1975) Initiation of cell proliferation in cultured mouse fibroblasts by prostaglandin F2α . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 72:2742

523 - HICKIE R.A., WEI J.-W., BLYTH L.M., WONG D.Y.W. & KLAASSEN D.J. (1983) Cations and calmodulin in normal and neoplastic cell growth regulation. **Can. J. Biochem. Cell Biol.** 61: 934

524 - WANG K.C., MUTUS B., SHARMA R.K., LAM H.-Y. P. & WANG J.H. (1983) On the mechanism of interaction between calmodulin and calmodulin-dependent proteins. **Can. J. Biochem. Cell Biol.** 61: 911

525 - NISHIZUKA Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. **Nature** 308: 693

526 - SCHLIWA M., EUTENEUER U., BULINSKY J.C. & IZANT J.C. (1981) Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78: 1037

527 - CROSSIN K.L. & CARNEY D.H. (1981) Evidence that microtubule depolymerization early in the cell cycle is sufficient to initiate DNA synthesis. **Cell** 23: 61

528 - CUTHBERT J.A. & SHAY J.W. (1983) Microtubules and lymphocyte responses: effect of colchicine and taxol on mitogen-induced human lymphocyte activation and proliferation. **J. Cell. Physiol.** 116: 127

529 - KOENIG H., GOLDSTONE A. & CHUNG Y.L. (1983) Polyamines regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response. **Nature** 305: 530

530 - MAINO V.C., GREEN H.M. & CRUMPTON M.J. (1974) The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes. **Nature** 251: 324

531 - DULBECCO R. & ELKINGTON J. (1975) Induction of growth in resting fibroblastic cell cultures by Ca^{++}. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 72: 1584

532 - LICHTMAN A.H., SEGEL G.B. & LICHTMAN M.A. (1983) The role of calcium in lymphocyte proliferation (an interpretive review). **Blood** 61: 413

533 - CHAPLINSKI T.J. & NIEDEL J.E. (1982) Cyclic nucleotide-induced maturation of human promyelocytic leukemia cells. **J. Clin. Invest.** 70: 953

534 - GROSS J.D., BRADBURY J., KAY R.R. & PEACEY M.J. (1983) Intracellular pH and the control of cell differentiation in Dictyostelium discoideum. **Nature** 303: 244

535 - KLAUSNER R.D., HARFORD J. & VAN RENSWOUDE J. (1984) Rapid internalization of the transferrin receptor in K562 cells is triggered by ligand binding or treatment with a phorbol ester. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81: 3005

536 - PELICCI P.G., TESTA U., THOMOPOULOS P., TABILIO A., VAINCHENKER W., TITEUX M., GOURDIN M.F. & ROCHANT H. (1984) Inhibition of transferrin binding and iron uptake of hematopoietic cell lines by phorbol esters. **Leukemia Res.** 8: 597

537 - CASTAGNA M., TAKAI Y., KAIBUEHI K., SANO K., KIKKAWA U. & NISHIZUKA Y. (1982) Direct activation of calcium activated, phospholipid dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters. **J. Biol. Chem.** 257: 7847

538 - WALLING C. (1975) Fenton's reagent revisited. **Accounts of Clin. Res.** 8: 125

539 - TIEN M., SVINGEN A. & AUST S.D. (1981) Superoxide dependent lipid peroxidation. **Fed. Proceedings** 40: 179

540 - HEYS A.D. & DORMANDY T.L. (1981) Lipid peroxidation in iron-overloaded spleens. **Clin. Science** 60: 295

A impressão desta tese foi parcialmente subsidiada pela Fundação Calouste Gulbenkian.