

AVALIAÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA PÓS-TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

EVALUATION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE AFTER BONE MARROW TRANSPLANTATION

Belinda P. Simões

Docente da Divisão de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da FMRPUSP

CORRESPONDÊNCIA: Laboratório de Hematologia, Hospital das Clínicas, Campus USP, 14048-900 Ribeirão Preto-SP,
E-mail: bpsimoes@fmrp.usp.br

Simões BP. Avaliação de doença residual mínima pós-transplante de medula óssea. **Medicina, Ribeirão Preto, 33:** 433-442, out./dez. 2000.

RESUMO: A detecção precoce de recaída pós-transplante de medula óssea é essencial para o sucesso das intervenções terapêuticas, como a infusão de linfócitos do doador. Na primeira parte desta revisão, são discutidos os principais métodos de detecção de doença residual mínima em pacientes transplantados para neoplasias hematológicas: citogenética convencional, hibridização "in situ" e reação em cadeia da polimerase (PCR). Na segunda parte, é discutida a aplicação desses métodos em pacientes transplantados para leucemia mielóide crônica ou leucemia aguda. Finalmente, avalia-se a análise de quimerismo pós-transplante, como método de detecção de doença residual mínima.

UNITERMOS: Transplante de Medula Óssea. Neoplasia Residual.

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos significativos avanços obtidos no tratamento das neoplasias hematológicas com o transplante de medula óssea, a recaída da doença pós-transplante continua sendo um empecilho importante para a obtenção da cura⁽¹⁾. Assim, métodos que possam detectar células tumorais residuais ou recaídas precoces, sem manifestação clínica, têm sido empregados amplamente na tentativa de se instituir a terapêutica adequada o mais precocemente possível.

Uma primeira questão importante refere-se à definição de remissão, quando tratamos de neoplasias hematológicas. É sabido que, mesmo com reduções significativas da massa tumoral, da ordem de 3 logs, podemos ter ainda em torno de 10^9 células tumorais no organismo. Uma neoplasia com 1 cm (tumores raramente detectáveis) contém em torno de 10^9 células,

sendo que um tumor letal é apenas 3 logs maior, ou seja, contém em torno de 10^{12} células. A quimioterapia elimina as células tumorais em frações do número total de células, ou seja, elimina 90% ou 99% ou 99,99% das células. Supondo um tumor de 10^{11} células ao diagnóstico, utilizando-se um quimioterápico com capacidade de eliminar 99,99% das células, ainda restariam 10^8 células tumorais. O limite de detecção clínica de um tumor gira em torno de 10^9 células, significando que o tumor residual com 10^8 células, não seria detectado, apesar do número grande de células residuais⁽¹⁾. Desta maneira, torna-se fundamental o emprego de métodos mais sensíveis para que se possa detectar número menor possível de células. Assim, **a doença residual mínima (DRM) pode ser definida como o limite mínimo de detecção de doença, em pacientes em remissão clínica completa, quando avaliados pelos métodos disponíveis⁽²⁾.**

2. MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA (DRM)

O exame de rotina, normalmente empregado para a detecção ou a definição de remissão em leucemias, é a análise morfológica da medula óssea. Os critérios aceitos são os de menos de 5% de blastos em medula óssea com a normalização do sangue periférico. É um valor arbitrário, que pode, teoricamente, estar associado a uma concentração de células tumorais residuais de 10^{10} . O exame não tem a capacidade de prever a recaída, sendo apenas capaz de diagnosticá-la, quando ocorre. Outros exames mais sensíveis, comumente utilizados, são os da citogenética convencional, a imunofenotipagem, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH – *fluorescent in situ hybridization*) e os métodos moleculares, em especial o PCR (*polymerase chain reaction*). A Tabela I descreve a sensibilidade de cada um dos métodos:

Tabela I - Sensibilidade dos métodos de detecção de Doença Residual Mínima.

| Método | Sensibilidade |
|---------------------------|---------------|
| Citologia | 5% |
| Citogenética Convencional | 1 – 5% |
| FISH | 1% |
| Imunofenotipagem | 0,1 – 1% |
| PCR | 0,0001 – 0,1% |

2.1. Citogenética convencional

Alterações citogenéticas ocorrem em até 70% das leucemias mielóides agudas e em 80% dos casos de leucemia linfóide aguda. Nos casos de doenças mieloproliferativas e síndromes mielodisplásicas, a porcentagem de casos com alterações cariotípicas é ainda mais elevada. A maioria dessas alterações são recorrentes e associadas a um tipo morfológico e específico de leucemia e, no caso das doenças mieloproliferativas, na verdade, o achado da alteração citogenética, normalmente, é essencial para a definição diagnóstica. A análise citogenética de rotina, no diagnóstico de pacientes portadores de leucemias, principalmente as leucemias agudas, define subgrupos prognósticos na dependência da alteração cromossômica encontrada⁽³⁾. Assim, estudos antigos já demonstravam o desaparecimento da alteração citogenética após o tratamento e o seu reaparecimento com a recaída⁽⁴⁾.

Portanto, para que se possa utilizar tal método, é preciso que a doença tenha um marcador conhecido ao diagnóstico. A vantagem da citogenética é que ela é capaz de detectar alterações clonais, estruturais e numéricas, e, quando presentes, mesmo em um número pequeno de células, apenas duas a três metáfases serão suficientes para determinar um clone neoplásico. Outra vantagem é que a citogenética poderá detectar alterações clonais novas, ou seja, evoluções clonais. A desvantagem principal do método, como ferramenta para a detecção de DRM, é sua baixa sensibilidade e a necessidade de um preparado citogenético adequado (qualidade das metáfases), o que nem sempre é fácil de se obter. Além disto, é preciso que um número grande de metáfases seja analisada para que se possa afirmar, com certeza, que não há células tumorais residuais. A necessidade de utilizar-se medula óssea e não sangue periférico para essas análises também o torna um método mais invasivo.

Inicialmente, muito utilizada para a detecção de recaída em pacientes submetidos a transplante de medula óssea por leucemia mielóide crônica e para avaliação de quimerismo pós-TMO, quando o paciente e o doador eram de sexo oposto, a citogenética convencional foi quase que totalmente substituída por técnicas mais sensíveis, como o FISH e métodos moleculares. Mas, mesmo assim, em pares de paciente-doador de sexos opostos e em doenças com alterações citogenéticas conhecidas, a citogenética pode, ainda, trazer informações e auxílio importantes.

2.2. Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Tal método veio possibilitar a análise de cromossomos em metáfase e em intérfase, não necessitando obrigatoriamente de que as células estejam em divisão. É realizado através da hibridização do preparado cromossômico com sondas específicas, tanto para regiões de quebra quanto para cromossomos inteiros. As sondas são, normalmente, marcadas com biotina ou digoxigenina, que podem, então, ser detectados com anticorpos conjugados com corantes fluorescentes. Para a detecção de translocações, são normalmente utilizadas duas sondas, uma para cada cromossomo envolvido, marcadas com moléculas distintas para produzir cores diferentes (Figura 1).

A grande vantagem do FISH é a possibilidade de se analisar um número grande de células rapidamente e de se identificar alterações estruturais por vezes não vistas na citogenética convencional. Principalmente na leucemia mielóide crônica, justaposições

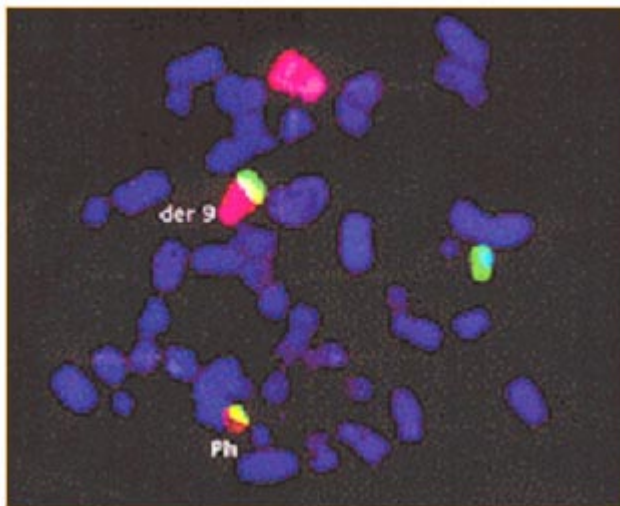


Figura 1: Detecção da translocação (9;22) por método de FISH. A sonda que marca o cromossomo 9 aparece em vermelho (superior central) e a que marca o cromossomo 22, em verde (mediano direito). Na translocação, ambos os sinais aparecem unidos (Ph), enquanto o cromossomo identificado por “der 9” é o produto não oncogênico da translocação recíproca.

bcr/abl não usuais podem ser identificadas com esse método. As desvantagens consistem em ser um método caro e na necessidade de se conhecer a alteração subjacente e ter à disposição sondas específicas para cada uma das alterações; sua sensibilidade é relativamente baixa, em torno de 1 a 5%. Tem a limitação também de uma marcação inespecífica de fundo, que resulta em proporção variável de falsos positivos, dependendo do sistema de detecção utilizado. Também os resultados falso-negativos, por hibridização ineficaz⁽⁵⁾, explicam as discrepâncias nos resultados obtidos em diferentes laboratórios. Tem ainda a desvantagem adicional de não ser capaz, na maioria das vezes, de identificar evoluções clonais.

Todos esses fatores devem ser sempre lembrados, ao considerarmos o FISH como método para a detecção de DRM. Mas, quando disponível, certamente pode e deve substituir a citogenética convencional na detecção da DRM, lembrando que sua sensibilidade pode chegar, no máximo, a 0,6%⁽⁶⁾. O papel da citogenética nesta era molecular foi bem discutido em uma revisão de Harrison⁽⁷⁾, na qual a autora ressalta a importância de se conhecerem as limitações e vantagens de cada método para poder utilizá-los em conjunto. O fato de a metodologia do FISH estar sendo aperfeiçoada intensamente, para poder torná-lo cada vez mais sensível, deverá, em breve, aproximá-lo dos métodos moleculares.

2.3. Citometria de fluxo

Tal metodologia, que é capaz de detectar células residuais por meio de métodos imunológicos; muito utilizada no diagnóstico de neoplasias hematológicas, sempre teve o inconveniente, quando utilizado para a detecção de DRM, de possuir número limitado de anticorpos capazes de identificar antígenos tumorais específicos, o que se deve ao fato de a grande maioria dos antígenos se expressarem também nas células normais. Apesar de o fenótipo das células tumorais ser normalmente idêntico ao das células normais, algumas células, principalmente aquelas com translocações que produzem proteínas de fusão, podem produzir proteínas anômalas que podem servir de marcadores tumorais. Alguns anticorpos monoclonais contra proteínas quiméricas já foram descritos⁽⁸⁾.

As estratégias imunológicas, porém, até o momento, são baseadas em marcações duplas ou triplas (dois ou três antígenos ao mesmo tempo), a fim de se identificarem “fenótipos tumorais”. A expressão dos antígenos pode estar alterada tanto quantitativa quanto qualitativamente, ou de ambos os modos, possibilitando dois tipos de análises. A alteração qualitativa pode também diferenciar blastos normais de leucêmicos. A informação, sem dúvida, mais importante quando tentamos detectar células residuais por imunofenotipagem, é a do perfil fenotípico da célula neoplásica ao diagnóstico⁽⁸⁾.

Mesmo com a vantagem de poder dar resultados em pouco tempo (algumas horas), a citometria de fluxo não tem sido um método muito empregado para a detecção de DRM pós TMO⁽⁹⁾, principalmente pela baixa sensibilidade e pela necessidade de se utilizar uma combinação de vários anticorpos a fim de ser capaz de detectar um fenótipo aberrante, algo que exige uma capacitação técnica importante. Entretanto, na detecção de doença residual mínima para leucemias agudas linfóides e mielóides após quimioterapia convencional, ele tem sido uma ferramenta útil de complementação diagnóstica^(8,10,11).

2.4. Polimerase Chain Reaction – PCR

Entre os métodos moleculares, sem dúvida, o mais sensível é o capaz de amplificar material genético, tanto DNA quanto RNA, a partir de sangue periférico ou MO, ou seja, o PCR. Outros métodos, como o *Southern blot*, que já foram utilizados no passado para a detecção de DRM, foi abandonado, por se tratar de técnica extremamente trabalhosa, que requer marcação radioativa das sondas e tem baixa sensibili-

dade (1 a 5%). Com o PCR, é possível amplificar uma região específica do genoma, sendo preciso, para tal, conhecer, pelo menos, as regiões próximas à região de interesse para que se possam construir os iniciadores da reação de amplificação, ou seja, os “primers”. Se a quebra na região a ser estudada estiver localizada em uma região pequena do gene, ela pode ser detectada a partir da amplificação do DNA. Caso os pontos de quebra estiverem dispersos por uma região grande do DNA, é necessário que seja feita a amplificação do gene já transcrito, ou seja, RNA. Em um primeiro passo, é transcrito o RNA para cDNA com a transcriptase reversa e, em seguida, amplifica-se o cDNA. O método é conhecido como **RT-PCR** (*reverse transcriptase PCR*). A reação pode, também, ser feita em uma amplificação única com apenas um par de *primers*, ou ser feita em dois passos de amplificação, utilizando-se dois pares de *primers* diferentes, o segundo par reconhecendo uma região mais interna, tornando a reação mais específica e mais sensível (Figura 2). Com tal metodologia, conhecida como **nested PCR**, uma célula tumoral poderá ser reconhecida entre 10^5 a 10^6 células normais. Sendo um método extremamente sensível, cautela máxima precisa ser tomada no laboratório para evitar contaminações e, desta forma, evitar obter resultados falsos-positivos. Assim, o PCR tem a desvantagem de necessitar de aparato laboratorial adequado e pessoal técnico treinado. Também é capaz de identificar, nas amplificações rotineiras, apenas seqüências já conhecidas para as quais *primers* estejam disponíveis.

O PCR poderá ser apenas **qualitativo**, ou seja,

apenas indicar a presença ou ausência de determinada alteração molecular, ou **quantitativo**, estimando a concentração de DNA ou o número de seqüências transcritas, no caso de RNA. A quantificação das seqüências amplificadas pelo PCR pode ser realizada por dois métodos principais: o PCR competitivo e o *real-time PCR*. No **PCR competitivo**, um competidor interno é preparado para cada gene que se queira estudar. A amostra e o competidor são amplificados na mesma reação e produzem seqüências de tamanhos diferentes, que podem ser identificadas em uma eletroforese em gel de agarose. Assim, conhecendo a concentração do competidor e fazendo reações com diluições seriadas, a concentração da amostra poderá ser estimada⁽¹²⁾. O *real-time PCR*⁽¹³⁾ tem como princípio estimar a quantidade de produtos do PCR na medida em que eles forem sendo sintetizados, diferentemente do PCR competitivo, que estima a concentração do produto final da amplificação. A padronização do PCR quantitativo e competitivo, com as suas diluições seriadas e a necessidade de um competidor, traz, por vezes, dificuldades metodológicas. O inconveniente do *real-time PCR* é que necessita de equipamento próprio que permita a detecção de fluorescência, equipamento ainda caro para poder se transformar, apesar de seus excelentes resultados, em método de escolha recomendado para todos os laboratórios. Mas, apesar das limitações de ambos os métodos, como o PCR quantitativo nos dá informações mais precisas a respeito do número de células tumorais residuais e a cinética das mesmas, se estão diminuindo ou aumentando em número, **recomenda-se que,**

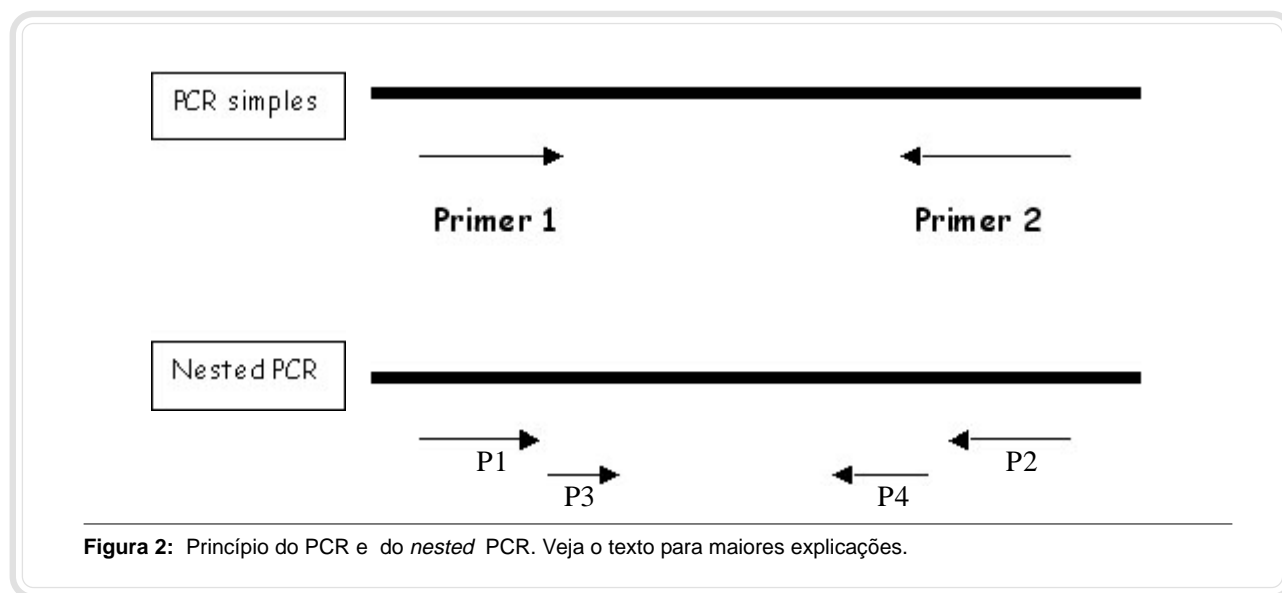


Figura 2: Princípio do PCR e do *nested PCR*. Veja o texto para maiores explicações.

para a avaliação de DRM, sejam empregados métodos quantitativos e não qualitativos. Em várias situações, é sabido que a detecção apenas qualitativa de seqüências anômalas pelo PCR, mesmo a t(9;22) da LMC ou as translocações encontradas nas leucemias mielóides agudas, como t(8;21), inv16, t(15;17) ou das leucemias linfóides agudas t(4;11), pode ocorrer após o TMO sem ter relação direta com a recaída.

No caso da leucemia mielóide crônica e das leucemias agudas que apresentam ao diagnóstico alterações cromossômicas estruturais, principalmente as translocações, a identificação das alterações e a detecção das mesmas, nas diferentes fases do tratamento, tem trazido informações úteis para o clínico. Nas leucemias linfóides agudas, nas quais não ocorrem comumente alterações estruturais, o rearranjo gênico específico, que o clone neoplásico apresenta, pode ser utilizado como marcador tumoral⁽²⁾. Os linfócitos, durante seu desenvolvimento, aproximam genes das regiões constante, variável e juncional (*joining*), a fim de produzir uma seqüência gênica mais curta, diferente de sua configuração não rearranjada. Tal rearranjo, VDJ, que é único para cada linfócito, pode, então, ser utilizado como o marcador específico daquela leucemia. Assim, podem ser construídos *primers* ou sondas específicas para cada rearranjo VDJ e utilizados em fase de remissão clínica para a detecção de DRM. Esse método, porém, apesar de ter se demonstrado muito útil no seguimento de crianças com leucemia linfóide aguda⁽¹⁴⁾, é um método trabalhoso e exige que se construam sondas ou *primers* específicos para cada paciente⁽¹⁵⁾.

2.5. Conclusão

O aspecto mais importante, na avaliação da DRM, é lembrar que cada método de detecção possui sua sensibilidade específica, suas vantagens e suas desvantagens, que devem ser consideradas pelo clínico que acompanha os pacientes, antes de guiar sua decisão terapêutica na dependência de um ou outro resultado. Infelizmente, os estudos de avaliação de DRM, em sua maioria, são compostos por número pequeno de casos utilizando-se sempre de uma ou outra abordagem. Raros são os trabalhos^(6,16) que compararam, de forma sistemática, diferentes metodologias, trazendo uma dificuldade adicional na escolha de um ou outro método. Talvez o melhor seja considerá-los como métodos complementares e não substitutos uns dos outros, levando em consideração as vantagens de cada um.

3. SIGNIFICADO DA DRM NO PACIENTE SUBMETIDO A TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

3.1. O paciente com Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

Tal patologia constitui-se em um modelo clínico de detecção e seguimento molecular de uma doença neoplásica. Ela foi a primeira leucemia à qual foi associada uma alteração cromossômica específica, o cromossomo Filadélfia (Ph)(t9;22)(q34;q11)⁽¹⁷⁾. Essa translocação resulta na formação de dois genes quiméricos, o *bcr/abl*, no cromossomo 22, e o *abl/bcr*, no cromossomo 9⁽¹⁸⁾. O *bcr/abl* é transcrito, na maioria dos casos de LMC, em uma proteína de fusão de 210 KD com atividade tirosinoquinase desregulada. Um fator prognóstico muito importante na LMC é a diminuição da carga tumoral que pode ser avaliada pela resposta hematológica (número de glóbulos brancos), resposta citogenética (número de metáfases Ph, positivas, residuais) e pela resposta molecular. Todos os métodos descritos no item 2 são, ou certamente já foram algum dia, utilizados no seguimento de pacientes submetidos a transplante de medula óssea. Os métodos citogenéticos, convencionais ou *FISH*, mesmo com os problemas metodológicos apontados acima baixa sensibilidade, custo elevado e chance de resultados tanto falsos-positivos quanto falsos-negativos, ainda têm sido empregados na detecção de DRM. Porém, o valor da citogenética, como método capaz de detectar precocemente a presença de DRM, é limitado nesta doença^(19/22).

Com o desenvolvimento dos métodos moleculares, surgia a possibilidade de identificar quantidades mínimas de células tumorais residuais. Os primeiros resultados, porém, utilizando-se o PCR, que buscaram definir o significado da presença de células tumorais residuais, em remissão clínica completa, foram inconsistentes^(23,24). As inconsistências encontradas foram devidas, principalmente, ao número pequeno de casos e ao fato de os mesmos serem constituídos de populações muito distintas, tratamentos diversos e, principalmente, constituídos de diferentes protocolos de amplificação do próprio PCR. Dois dos trabalhos com maior número de casos, ambos publicados em 1995, foram os de Radich et al.⁽²⁵⁾ e de Pichert et al.⁽²⁶⁾. O primeiro avaliou 634 amostras colhidas entre três e 199 meses pós-TMO de 346 pacientes. Os autores demonstraram que a positividade do *bcr/abl* até três meses pós-TMO não se correlacionava com a recaída

da, já se o PCR fosse positivo entre seis e 12 meses pós-TMO, era, estatisticamente, relacionado à recaída. O risco relativo de recaída dos pacientes com PCR positivo era de 26,1. Pichert et al., analisando 480 amostras de 92 pacientes, sendo 48 transplantes com depleção de células T e 44 sem depleção, demonstraram, além do papel da doença residual como fator de risco de recaída, também o papel imunológico da reação enxerto-versus-leucemia: em 80% dos pacientes submetidos à depleção de células T, encontrava-se o bcr/abl entre os meses seis e 24 pós-TMO, enquanto que, em apenas 25% dos transplantes realizados sem depleção de células T, era identificada a DRM. Assim, os métodos qualitativos, e mesmo os primeiros quantitativos, sugeriam que a positividade precoce pós-TMO não tinha relação direta com a recaída⁽²⁷⁾. A importância de análises seriadas mais constantes e o papel da detecção precoce do bcr/abl em relação à recaída foi descrita por Olavarria et al.⁽²⁸⁾, que, estudando amostras a cada três meses pós-TMO, demonstrou que a positividade, já aos três meses, quando analisada por PCR quantitativo, tinha correlação estatisticamente significativa com recaída.

Com a possibilidade de se tratarem as recaídas pós-TMO com infusão de linfócitos do doador⁽²⁹⁾, era necessário determinar, com segurança e o mais precocemente possível, a recaída, para obter a melhor resposta terapêutica. Métodos menos sensíveis, mesmo citogenéticos, quando detectam células tumorais, muitas vezes, não propiciam intervenções terapêuticas para evitar a recaída hematológica. Era, portanto, necessário utilizar os resultados de PCR para a tomada de decisões clínicas. A discussão da utilização dos dados de PCR para a tomada de decisões terapêuticas foi, assim, publicamente aventada em 1999^(31/34) e suscitou ampla discussão. Faderl et al.⁽³⁰⁾ apontaram vários dos problemas metodológicos que envolviam método diagnóstico tão sensível, afirmando que, na literatura, ainda não havia dados suficientes para se dizer, com certeza, se doença residual persistente era capaz de prever a recaída, e alertando para o risco de se tomarem decisões terapêuticas, baseando-se no resultado do PCR. Havia, na maioria dos estudos, casos persistentemente positivos que não recaíam. Com métodos de quantificação cada vez mais sensíveis, provavelmente não restariam, em breve, pacientes PCR negativos e um limiar deveria ser definido, acima do qual a possibilidade de recaída devesse ser tratada. A questão levantada por Faderl e seus colaboradores recebeu várias respostas^(31,32,33), em sua maioria, refu-

tando a cautela do mesmo e afirmando que decisões clínicas deveriam, sim, ser tomadas, tendo como base o PCR quantitativo.

A falta, porém, até o momento, de uma melhor padronização e, principalmente, uniformização dos protocolos de PCR quantitativo, não permite ainda que se defina o limiar acima do qual pacientes com LMC devam ser submetidos a terapêutica adicional. Mesmo assim, algumas tentativas de estabelecer critérios baseados no PCR já foram publicadas^(34,35). Com a introdução do *real-time PCR*, talvez tenhamos, nos próximos anos, uma melhor padronização e definição para a questão crucial: o que significa manter células bcr/abl no organismo? Outro dado interessante é a observação de que pacientes que apresentam o bcr/abl pelo FISH muitos anos após o TMO apresentam, por vezes, bcr/abl negativos pelo PCR^(21,36). Esse fato poderia ser explicado pela presença da alteração estrutural no DNA sem, porém, ocorrer transcrição do mesmo para o RNA.

Assim, ainda não existe um número aceito de células residuais acima do qual se recomenda o tratamento do paciente. Podemos dizer, de forma geral, quando um método quantitativo de PCR é empregado, que: 1) pacientes que eram bcr/abl negativos e passam a ser bcr/abl positivos devem receber tratamento, 2) pacientes cujo nível de transcrição seja alto são fortes candidatos à recaída da doença e, 3) naqueles nos quais há baixos níveis de transcrição, ou níveis que estejam diminuindo, o risco de recaída é extremamente baixo.

3.2. O paciente com leucemia aguda

O papel da DRM, em crianças portadoras de leucemia linfóide aguda, já está bem estabelecido na literatura e vários trabalhos demonstraram sua relação com a recaída da doença. Assim, há, nesse subgrupo de pacientes, estudos extensos, empregando metodologia quantitativa^(2,14,15), porém, em todos os casos, trata-se de avaliação pós-quimioterapia convencional. Pouco se sabe da avaliação pós-TMO nessa patologia e, em grande parte dos casos pediátricos, a avaliação se dá através do estudo de polimorfismos genéticos e avaliação de quimerismo, como discutido no item a seguir.

Para o acompanhamento da leucemia mielóide aguda, tanto infantil como em adulto, todos os métodos acima descritos já foram utilizados. O papel da DRM em leucemias mielóides agudas pós-TMO também ainda é pouco conhecido. Em pacientes submeti-

dos a quimioterapia convencional, algumas das translocações, como t(8;21), t(15;17) e inv16, não mostraram, nos estudos iniciais, relação direta com recaída, já que, em muitos pacientes, detectava-se, por longos anos, a translocação por métodos moleculares sem recaída da doença. Trabalhos mais recentes e, principalmente, com a introdução do *real-time PCR*, também neste grupo de doenças, demonstraram que a quantificação mais acurada de células residuais tumorais parece ter significado prognóstico^(37/40).

4. A ANÁLISE DO QUIMERISMO PÓS-TMO COMO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE DRM

Ele não é, na verdade, um método distinto, pois pode ser realizado por diversos dos métodos acima descritos. Utilizam-se diferenças entre as células do doador e do paciente para a identificação de populações mistas (quimeras) em medula óssea ou sangue periférico. Fala-se em **quimera completa**, quando todas as células hematopoéticas pós-TMO são de origem do doador, em **quimera mista** ou **parcial** quando persistem células do paciente junto com as células recebidas do doador. Como nem todas as doenças neoplásicas apresentam um marcador tumoral, como a leucemia mielóide crônica, outras diferenças genéticas entre doador e paciente podem ser utilizadas, não apenas para detectar a pega da medula óssea doada, mas, também, para a identificação de células residuais do paciente, possivelmente neoplásicas.

As primeiras avaliações de quimerismo foram feitas pela identificação de antígenos eritrocitários por métodos sorológicos. Hoje, os dois métodos mais utilizados para tal fim são a hibridização *in situ* com sondas sexo-específicas (cromossomos X e Y) e os métodos moleculares que identificam polimorfismos gênicos, os chamados VNTR's (*variable number of tandem repeats*). A hibridização *in situ*, obviamente, só poderá ser utilizada, quando paciente e doador são de sexos opostos.

A análise de VNTR's, que são regiões repetitivas no genoma humano, baseia-se no fato de que essas repetições podem ocorrer em número distinto, mesmo entre irmãos HLA idênticos. Essas repetições podem ser compostas por "microssatélites", quando conjuntos de dois a oito pares de bases nitrogenadas do DNA estão repetidos (por ex. CACACA) ou por "minissatélites" compostos por repetições de oito a 50 pares de bases (por ex. o

DIS80 – GAAGACCACAGGAAAG). Essas seqüências são herdadas como traços mendelianos codominantes. Muitas das regiões são disponíveis para estudo e, com uma associação de até seis regiões, virtualmente todos os pares de irmãos podem ser identificados.

A análise dos polimorfismos pode ser feita tanto por *Southern blot* quanto por PCR, mas como o *Southern blot* é um método muito trabalhoso e que requer uma quantidade de DNA considerável, atualmente, na prática, todos os laboratórios usam o PCR para tal fim.

A questão a ser levantada, quando se utiliza o estudo de quimerismo como método de avaliação de DRM, é saber se as células residuais do paciente são obrigatoriamente neoplásicas e qual a possibilidade de recaída do paciente se ele se mantiver como quimera mista. Relatos de casos já sugeriam que essa poderia ser uma abordagem alternativa importante na detecção de DRM. Atualmente, a resposta à pergunta feita acima ainda se encontra em aberto: alguns trabalhos consideram a avaliação do quimerismo método capaz de detectar e prever a recaída^(41/45), já outros questionam o valor de tal abordagem ou preconizam que ela deveria ser utilizada em conjunto com a detecção de células residuais tumorais^(46,47). Nos transplantes não mieloablativos, a quantificação do quimerismo pós-TMO tem guiado as decisões terapêuticas⁽⁴⁸⁾, tornando-se, assim, nesse tipo de abordagem terapêutica específica, uma ferramenta fundamental de seguimento. A grande vantagem da detecção do quimerismo em relação à detecção de células tumorais residuais é que, na primeira abordagem, partimos, normalmente, de DNA e não RNA como substrato, tornando-o um método mais simples do que o das reações de identificação de translocações que são, em sua maioria, baseados no RT-PCR.

5. CONCLUSÕES

A literatura é repleta de trabalhos que buscam definir as melhores estratégias e os métodos mais sensíveis para a detecção de DRM, buscando, desta maneira, identificar, de forma mais precoce e com a maior sensibilidade possível, a recaída ou a permanência de células tumorais residuais pós-TMO. Infelizmente, os trabalhos, em sua maioria, constituem-se de casuísticas pequenas, de populações heterogêneas e metodologias distintas, o que tem dificultado, sobremaneira, a comparação e a definição de qual limite de

detecção deva ser empregado para tratar-se o paciente. A busca de métodos cada vez mais sensíveis, possivelmente, deixará de identificar, em breve, pacientes PCR negativos, tornando o significado do achado do PCR positivo ainda mais questionável. Assim,

até o momento, os vários métodos de detecção de DRM devem ser compreendidos como complementares entre si e a decisão clínica precisa ser tomada, levando em consideração os múltiplos aspectos levantados nesta revisão.

SIMÕES BP. Evaluation of minimal residual disease after bone marrow transplantation. **Medicina, Ribeirão Preto**, **33**: 433-442, oct./dec. 2000.

ABSTRACT: Early detection of relapse after bone marrow transplantation is essential for the success of therapeutic approaches such as donor lymphocyte infusions. In the first part of this review we discuss methods to detect minimal residual disease in patients transplanted with hematological neoplasms: conventional cytogenetics, in situ hybridization and polymerase chain reaction. In the second part, application of these methods for patients transplanted with chronic myelogenous leukemia or acute leukemias is discussed. Finally, chimerism analysis is evaluated as a method to detect minimal residual disease.

UNITERMS: Bone Marrow Transplantation. Neoplasm, Residual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - RADICH JP & SLOVAK ML. The laboratory evaluation of Minimal Residual disease. In: THOMAS ED; BLUME KG & FORMAN SJ. **Hematopoietic stem cell transplantation**, 2th ed. Blackwell-Science, Oxford, UK, p. 235-247, 1999.
- 2 - FORONI L; HARRISON CJ; HOFFBRAND AV & POTTER MN. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia by molecular analysis. **Br J Haematol** **105**: 7-24, 1999.
- 3 - WHEATLEY K; BURNETT AK; GOLDSTONE AH; GRAY RG; HANN IM; HARRISON CJ; REES JK; STEVENS RF & WALKER H. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk- directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. **Br J Haematol** **107**:69-79, 1999.
- 4 - HART JS; TRUJILLO JM; FREIREICH EJ; GEORGE SL & FREI E. Cytogenetic studies and their clinical correlates in adults with acute leukemia. **Ann Intern Med** **75**:353-360, 1971.
- 5 - CHASE A; GRAND F; ZHANG JG; BLACKETT N; GOLDMAN J & GORDON M. Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in situ hybridization. **Genes Chromosom Cancer** **18**: 246-253, 1997.
- 6 - IQBAL S; GRIMWADE D; CHASE A; GOLDSTONE A; BURNETT A; GOLDMAN JM & SWIRSKY D. Identification of PML/RARalpha rearrangements in suspected acute promyelocytic leukemia using fluorescence in situ hybridization of bone marrow smears: a comparison with cytogenetics and RT-PCR in MRC ATRA trial patients. MRC Adult Leukaemia Working Party. **Leukemia** **14**: 950-953, 2000.
- 7 - HARRISON CJ. The management of patients with leukaemia: the role of cytogenetics in this molecular era. **Br J Haematol** **108**: 19-30, 2000.
- 8 - CAMPANA D & COUSTAN-SMITH E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. **Cytometry** **38**: 139-152, 1999.
- 9 - NAGLER A; CONDIOTTI R; RABINOWITZ R; SCHLESINGER M; NGUYEN M; TERSTAPPEN LW. Detection of minimal residual disease (MRD) after bone marrow transplantation (BMT) by multi-parameter flow cytometry (MPFC). **Med Oncol** **16**: 177-187, 1999.
- 10 - WARD MS. The use of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of malignant hematological disorders. **Pathology** **31** 382-392, 1999.
- 11 - GAIPA G; VAN WERING E & van DONGEN JJ. Immunophenotypical detection of minimal residual disease in acute leukemia. **Crit Rev Oncol Hematol** **32**:175-185, 1999.
- 12 - van DONGEN JJ; MACINTYRE EA; GABERT JA; DELABESSE E; ROSSI V; SAGLIO G; GOTTARDI E; RAMBALDI A; DOTTI G; GRIESINGER F; PARREIRA A; GAMEIRO P; DIAZ MG; MALEC M; LANGERAK AW; SAN MIGUEL JF & BIONDI A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. **Leukemia** **13**:1901-1928, 1999.
- 13 - MENSINK E; VAN DE LOC&; DE WITTE T. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia patients using real-time RT-PCR. **Br J Haematol** **102**: 768-774, 1998.

- 14- van DONGEN JJ; SERIU T; PANZER-GRUMAYER ER; BIONDI A; PONGERS-WILLEMSE MJ; CORRAL L; STOLZ F; SCHRAPPE M; MASERA G; KAMPS WA; GADNER H; VAN WERING ER; LUDWIG WD; BASSO G; DE BRUIJN MA; CAZZANIGA G; HETTINGER K; VAN DER DOES-VAN DEN BERG A; HOP WC; RIEHM H & BARTRAM CR. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. **Lancet** **352**:1731-1738, 1998.
- 15 - CAVE H; VAN DER WERFF TEN BOSCH J; SUCIU S; GUIDAL C; WATERKEYN C; OTTEN J; BAKKUS M; THIELEMANS K; GRANDCHAMP B & VILMER E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer—Childhood Leukemia Cooperative Group. **N Engl J Med** **339**:591-598, 1998.
- 16- DUBOVSKY J; DAXBERGER H; FRITSCH G; PRINTZ D; PETERS C; MATTHES S; GADNER H; LION T; MULLER-BERAT N; WATTJES MP; KRAUTER J; NAGEL S; HEIDENREICH O; GANSER A & HEIL G. Comparison of nested competitive RT-PCR and real-time RT-PCR for the detection and quantification of AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21) positive acute myelogenous leukemia. **Leukemia** **14**:329-335, 2000.
- 17 - NOWELL PC & HUNGERFORD DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science** **132**: 1497-1501, 1960.
- 18 - STAM K; HEISTERKAMP N; GROSVELD G; DE KLEIN A; VERMARS; COLEMAN M; DOSIK H & GROFFEN J. Evidence of a new chimeric bcr/abl mRNA in patients with chronic granulocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. **N Engl J Med** **313**: 1429-1433, 1985.
- 19 - TAMURA S; SAHEKI K; TAKATSUKA H; WADA H; FUJIMORI Y; OKAMOTO T; TAKEMOTO Y; HASHIMOTO-TAMAOKI T; FURUYAMA J & KAKISHITA E. Early detection of relapse and evaluation of treatment for mixed chimerism using fluorescence in situ hybridization following allogeneic hematopoietic cell transplant for hematological malignancies. **Ann Hematol** **79**:622-626, 2000.
- 20 - SEONG CM; GIRALT S; KANTARJIAN H; XU J; SWANTKOWSKI J; HAYES K; GLASSMAN AB; KHOURI I; KORBLING M; THALL P; SICILIANO MJ & CHAMPLIN RE. Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. **J Clin Oncol** **18**:1831-1836, 2000.
- 21 - CHOMEL JC; BRIZARD F; VEINSTEIN A; RIVET J; SADOON A; KITZIS A; GUILHOT F & BRIZARD A. Persistence of BCR-ABL genomic rearrangement in chronic myeloid leukemia patients in complete and sustained cytogenetic remission after interferon-alpha therapy or allogeneic bone marrow transplantation. **Blood** **95**: 404-408, 2000.
- 22 - DEWALD GW; JUNEAU AL; SCHAD CR & TEFFERI A. Cytogenetic and molecular genetic methods for diagnosis and treatment response in chronic granulocytic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet** **94**: 59-66, 1997.
- 23 - HUGHES T; MARTIAT P; MORGAN G; SAWYERS C; WITTE ON & GOLDMANN JM. Significance of residual leukaemia transcripts after bone marrow transplant for CML. **Lancet** **335**: 50, 1990.
- 24 - HUGHES T; JANNSEN JW; MORGAN G; MARTIAT P; SAGLIO G; PIGNON JM; PIGNATTI FP; MILLS K; KEATING M; GLUCKMAN E; BARTRAM CR & GOLDMAN JM. False-positive results with PCR to detect leukaemia-specific transcript. **Lancet****335**: 1037-1038, 1990.
- 25 - RADICH JP; GEHLY G; GOOLEY T; BRYANT E; CLIFT RA; COLLINS S; EDMANDS S; KIRK J; LEE A & KESSLER P. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. **Blood** **85**: 2632-2638, 1995.
- 26 - PICHERT G; ROY DC; GONIN R; ALYEA EP; BELANGER R; GYGER M; PERREAULT C; BONNY Y; LERRA IM & MURRAY C. Distinct patterns of minimal residual disease associated with graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. **J Clin Oncol** **13**: 1704-1713, 1995.
- 27 - HOCHHAUS A; WEISSER A; LA ROSEE P; EMIG M; MULLER MC; SAUSSELE S; REITER A; KUHN C; BERGER U; HEHLMANN R & CROSS NC. Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. **Leukemia** **14**: 998-1005, 2000.
- 28 - OLAVARRIA E; KANFER E; SZYDLO R; KAEDA J; REZVANI K; Cwynarski K; POCOCCO C; DAZZI F; CRADDOCK C; APPERLEY JF; CROSS NCP & GOLDMAN JM. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. **Blood** **97**: 1560-1565, 2001.
- 29 - KOLB HJ; MITTERMULLER J; CLEMM C; HOLLER E; LEDDEROSE G; BREHM G; HEIM M & WILMANN S W Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. **Blood** **76**: 2462-2465, 1990.
- 30 - FADERL S; TALPAZ M; KANTARJIAN HM & ESTROV Z. Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making? **Blood** **93**: 2755-2759, 1999.
- 31 - GOLDMAN JM; KAEDA JS; CROSS NC; HOCHHAUS A & HEHLMANN R. Clinical decision making in chronic myeloid leukemia based on polymerase chain reaction analysis of minimal residual disease. **Blood** **94**: 1484-1486, 1999.
- 32- LION T. Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia by quantitative polymerase chain reaction and clinical decision making. **Blood** **94**: 1486-1488. 1999.
- 33 - MORAVCOVA J; NADVORNIKOVA S; LUKASOVA M & KLAMOVA H. Polymerase chain reaction analyses should be used as a basis for clinical decision making in patients with chronic myelogenous leukemia. **Blood** **94**: 3609-3611, 1999.
- 34- CROSS NCP. Minimal Residual Disease in CML. **Hematol Cell Ther** **40**: 224-228, 1998.
- 35- ROMAN J; ALVAREZ MA & TORRES A. Molecular basis for therapeutic decisions in chronic myeloid leukemia patients after allogeneic bone marrow transplantation. **Haematologica** **85**: 1072-1082, 2000.

- 36 - VETTENRANTA K; HUHTA T; LINDLOF M; KNUUTILA S & SAARINEN-PIHKALA UM. Combined RT-PCR and metaphase-FISH posttransplant studies in pediatric patients with chronic myeloid leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol** **20**:108-111, 1998.
- 37 - ELMAAGACLI AH; BEELEN DW; KROLL M; TRZENSKY S; STEIN C & SCHAEFER UW. Detection of CBFbeta/MYH11 fusion transcripts in patients with inv(16) acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood progenitor cell transplantation. **Bone Marrow Transplant** **21**:159-166, 1998.
- 38 - VENDITTI A; BUCCISANO F; DEL POETA G; MAURILLO L; TAMBURINI A; COX C; BATTAGLIA A; CATALANO G; DEL MORO B; CUDILLO L; POSTORINO M; MASI M & AMADORI S. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. **Blood** **96**: 3948-3952, 2000.
- 39 - SUGIMOTO T; DAS H; IMOTO S; MURAYAMA T; GOMYO H; CHAKRABORTY S; TANIGUCHI R; ISOBE T; NAKAGAWA T; NISHIMURA R & KOIZUMI T. Quantitation of minimal residual disease in t(8;21)-positive acute myelogenous leukemia patients using real-time quantitative RT-PCR. **Am J Hematol** **64**:101-106, 2000.
- 40 - MORSCHHAUSER F; CAYUELA JM; MARTINI S; BARUCHEL A; ROUSSELOT P; SOCIE G; BERTHOU P; JOUET JP; STRAETMANS N; SIGAUX F; FENAUX P & PREUDHOMME C. Evaluation of minimal residual disease using reverse-transcription polymerase chain reaction in t(8;21) acute myeloid leukemia: a multicenter study of 51 patients. **J Clin Oncol** **18**:788-794, 2000.
- 41 - BADER P; BECK J; SCHLEGEL PG; HANDGRETINGER R; NIETHAMMER D & KLINGEBIEL T. Additional immunotherapy on the basis of increasing mixed hematopoietic chimerism after allogeneic BMT in children with acute leukemia: is there an option to prevent relapse? **Bone Marrow Transplant** **20**:79-81, 1997.
- 42 - BADER P; HOLLE W; KLINGEBIEL T; HANDGRETINGER R; BENDA N; SCHLEGEL PG; NIETHAMMER D & BECK J. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. **Bone Marrow Transplant** **19**: 697-702, 1997.
- 43 - BADER P; BECK J; FREY A; SCHLEGEL PG; HEBARTH H; HANDGRETINGER R; EINSELE H; NIEMEYER C; BENDA N; FAUL C; KANZ L; NIETHAMMER D & KLINGEBIEL T. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. **Bone Marrow Transplant** **21**:487-495, 1998.
- 44 - ROMAN J; SERRANO J; JIMENEZ A; CASTILLEJO JA; REINA ML; GONZALEZ MG; RODRIGUEZ MC; GARCIA I; SANCHEZ J; MALDONADO J & TORRES A. Myeloid mixed chimerism is associated with relapse in bcr-abl positive patients after unmanipulated allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. **Haematologica** **85**:173-180, 2000.
- 45 - CHOI SJ; LEE KH; LEE JH; KIM S; CHUNG HJ; LEE JS; KIM SH; PARK CJ; CHI HS & KIM WK. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. **Bone Marrow Transplant** **26**:327-332, 2000.
- 46 - ORTEGA M; ESCUDERO T; CABALLIN MR; OLIVE T; ORTEGA JJ; COLL MD. Follow-up of chimerism in children with hematological diseases after allogeneic hematopoietic progenitor cell transplants. **Bone Marrow Transplant** **24**: 81-87, 1999.
- 47 - FORMANKOVA R; HONZATKOVA L; MORAVCOVA J; SIEGLOVA Z; DVORAKOVA R; NADVORNIKOVA S; VITEK A; LUKASOVA M; STARY J & BRDICKA R. Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy. **Leuk Res** **24**:339-347, 2000.
- 48 - HUANG CA; FUCHIMOTO Y; SCHEIER-DOLBERG R; MURPHY MC; NEVILLE DM; SACHS DH. Stable mixed chimerism and tolerance using a nonmyeloablative preparative regimen in a large-animal model. **J Clin Invest** **105**:173-181, 2000 .

Recebido para publicação em 25/10/2000

Aprovado para publicação em 20/12/2000