

CO-EVOLUÇÃO DA TERAPÊUTICA E DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Co-evolution of the treatment and molecular diagnosis of chronic myeloid leukemia

FERNANDA PICCARDI IMPARATO¹ CARLA L. MENEZES² AGNALDO ANELLI³ RICARDO M. OLIVEIRA⁴ OTÁVIA L. CABALLERO⁵ ANDREW J.G. SIMPSON⁶

A leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada geneticamente pela presença do cromossomo Filadélfia, que resulta da translocação recíproca de material genético entre os cromossomos 9 e 22. O gene quimérico bcr/abl, que codifica uma proteína com atividade de tirosina-quinase, parece ser essencial para a manutenção da malignidade. Detecção do transcrito bcr/abl pela reação em cadeia da polimerase (PCR) oferece uma técnica sensível, rápida e altamente sensível para diagnóstico de LMC. A doença que era invariavelmente fatal é atualmente potencialmente curável por transplante alogênico de medula óssea (TMO). O sucesso do tratamento em casos individuais pode ser monitorado pela detecção de células malignas individuais. Pacientes sem células tumorais detectadas de seis meses a um ano após o transplante têm pouca probabilidade de recidiva. Aqueles com células tumorais detectáveis em duas análises consecutivas têm maior risco de recidiva, indicando que uma terapia adicional seria apropriada. Apresentamos uma revisão dos aspectos clínicos, alterações citogenéticas e moleculares que caracterizam a LMC, assim como a co-evolução da terapia anti-LMC e o diagnóstico laboratorial.

Palavras-chave: Leucemia mielóide crônica, diagnóstico, terapêutica. Transplante de medula óssea. Cromossomo Filadélfia.

Key words: Chronic myeloid leukemia, diagnosis, therapy. Bone marrow transplantation. Philadelphia chromosome.

1 - Médica-residente do Depto de Oncologia Clínica - Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP.

2 - Bióloga do Depto de Patologia Clínica e Hemoterapia - Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP.

3 - Chefe do Depto de Oncologia Clínica - Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP.

4 - Chefe do Depto de Patologia Clínica e Hemoterapia - Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP.

5 - Professora Assistente do Depto de Ciências Biológicas, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG.

Pós-graduanda no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, SP.

6 - Chefe do Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer -SP.

Endereço para correspondência: Dr. Andrew J. G. Simpson: Rua Prof. Antonio Prudente, 109, 4º andar- Liberdade - São Paulo - SP - CEP 10509-010 - Tel.: (011) 270-4922 - Fax: (011) 270-7001.

Introdução Observações clínicas gerais

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é caracterizada como uma expansão clonal de células mielóides, compreendendo cerca de 10% a 15% de todas as leucemias, tendo sua maior incidência na quarta década de vida, podendo, no entanto, afetar também crianças e idosos (1).

Com a descoberta de uma alteração cromossômica presente na grande maioria dos pacientes com LMC, inicialmente tida como um achado, e atualmente implicada na etiologia da doença, métodos moleculares baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction) foram desenvolvidos. Esses métodos possibilitaram, de maneira sensível e específica, tanto o diagnóstico de certeza da doença, quanto da presença de doença residual mínima (DRM) após tratamento medicamentoso ou transplante de medula óssea (TMO), permitindo assim a exata avaliação da eficácia de cada um desses procedimentos.

Clinicamente, observam-se três fases da doença. A fase crônica é de duração aproximada de três a quatro anos e manifesta-se por

sintomas vagos: mal-estar, fadiga, perda de peso, cefaléia, plenitude pós-prandial e desconforto no hipocôndrio esquerdo. Alguns pacientes (20%-30%) apresentam-se assintomáticos. Ao exame físico, os achados mais freqüentes são hepatoesplenomegalia e adenopatias periféricas. O hemograma mostra alterações na linhagem branca, com leucocitoses variáveis entre $20 \times 10^9/L$ até $600 \times 10^9/L$ com aproximadamente 20% de formas mielóides jovens. No mielograma é observada hiperplasia granular com hiperplasia granular e megacariocítica.

A fase acelerada é uma transição gradual para a fase blástica com duração aproximada de três a seis meses. Cerca de 15% dos pacientes entram nesta fase. Os sintomas sistêmicos como a leucocitose e hepatoesplenomegalia, que anteriormente eram bem controlados com tratamento medicamentoso, tornam-se resistentes à terapêutica e se exacerbam. Nesta fase, o hemograma demonstra aumento do número de mieloblastos, basófilos e eosinófilos, assim como o aparecimento de anemia e plaquetopenia.

A terceira fase é denominada fase blástica, com cerca de 85% dos pacientes apresentando este quadro de forma súbita ou gradual. Esta fase é caracterizada pela presença de um mínimo de 30% de mieloblastos na medula óssea ou sangue periférico. Clinicamente, os pacientes apresentam-se com febre, sudorese noturna, perda de peso rápida, dores ósseas, dor no hipocôndrio esquerdo (por esplenomegalia ou infartos esplênicos), infiltrações cutâneas ou meníngeas, sinais de sangramentos ou infecções, leucoestase (principalmente em pacientes que tiveram transformação abrupta para a fase blástica). Os achados de anemia e plaquetopenia são freqüentes. A crise blástica geralmente é refratária ao tratamento, independentemente do tipo de diferenciação celular e ocasionalmente pode ter duas ou mais linhagens. Sessenta por cento dos casos são de origem mielóide, 20% de origem linfóide, 15% indiferenciadas e os 5% restantes originam-se de megacarioblastos, eritroblastos ou pró-granulocitoblastos. Nesta fase, a sobrevida mediana é de dois a quatro meses. A única exceção são os casos que evoluem para crise blástica de origem linfóide, em que as taxas de resposta estão em torno de 40%-70%, com durações das remissões em torno de 6 a 12 meses e com uma sobrevida mediana de 9 a 12 meses (1).

Estudos genéticos

Apesar de possuir uma apresentação clínica variada, as alterações citogenéticas e moleculares desta doença estão bem estabelecidas através de técnicas desenvolvidas a partir de 1960, que foram responsáveis pelos grandes avanços na compreensão, classificação e evolução do tratamento desta neoplasia.

O primeiro sucesso no estudo citogenético do câncer foi o descobrimento realizado por Peter Nowell e David Hungerford em 1960 do cromossomo Filadélfia em pacientes portadores de LMC (2). Este cromossomo pequeno foi a primeira anormalidade

cromossômica detectada em neoplasias humanas. Durante quase uma década, o cromossomo Filadélfia permaneceu como um achado excepcional até que, com o aparecimento da técnica de bandeamento de cromossomos, na década de 70, esta e outras neoplasias hematológicas, assim como tumores sólidos, tiveram as suas alterações cromossômicas relevadas e descritas de forma precisa.

Em 1973 Rowley (3) demonstrou que o cromossomo Filadélfia resulta de uma translocação recíproca de material genético entre o cromossomo 9 e o cromossomo 22, definido citogeneticamente como $t(9;22)(q34;q11)$ como mostra a figura 1. O proto-oncogene

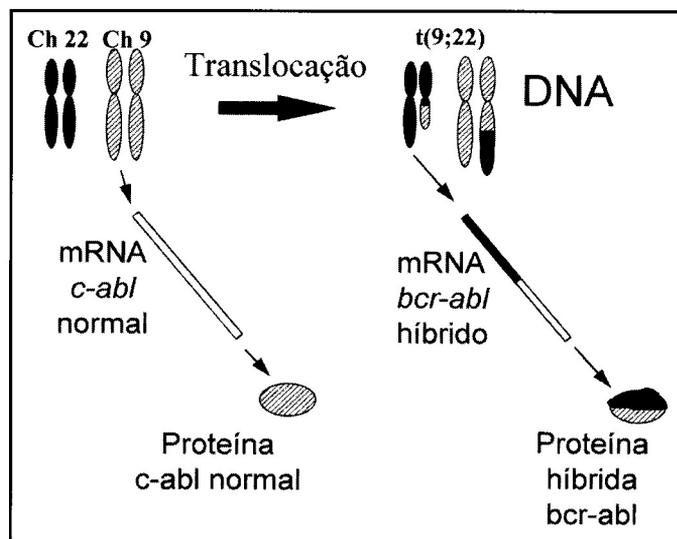


FIGURA 1: Síntese de *bcr-abl* pelo cromossomo Filadélfia ($t(9;22)$) Representação esquemática da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, o que resulta na fusão dos genes *bcr* e *abl* e conseqüente formação de um mRNA e proteína híbridos.

c-abl (Abelson) localizado no braço longo do cromossomo 9 é translocado para o braço longo do cromossomo 22 no gene *bcr*, provocando o encurtamento do braço longo do cromossomo 22. Desta fusão forma-se um gene quimérico *bcr/abl*, cujo produto é um RNA mensageiro híbrido (mRNA) *bcr/abl*, de 8,5 kb. Este mRNA codifica uma proteína híbrida de 210 Kd, com atividade de tirosinaquinase, similar à proteína codificada pelo gene *c-abl*, que tem localização exclusivamente nuclear, porém mais ativa e com localização citoplasmática (4). Por causa dessa alta atividade específica e nova localização na célula, *bcr/abl* tem acesso a substratos citoplasmáticos que a proteína *c-abl* não tem, e as fosforila de uma maneira desordenada. A grande correlação entre a presença da proteína *bcr/abl* hiperativa e LMC a implica na etiologia dessa patologia. Vários estudos com modelos animais ou de cultura *in vitro* têm demonstrado que a presença desse transcrito transforma células hematopoéticas normais e fibroblastos (4,5). Outros estudos mostraram que a introdução de *bcr/abl* em animais provoca distúrbios clínicos que se assemelham à LMC, indicando uma relação causal entre o rearranjo *bcr/abl* e o desenvolvimento de LMC (6,7).

Na LMC, os pontos de ruptura (break points) no cromossomo 22 estão restritos a uma região de 5,8 kb chamada de *Mbcr* (major break point cluster region) localizada na porção central do gene. O ponto de ruptura exato difere de um indivíduo para outro na LMC, porém geralmente ocorre entre os exons 2 e 3, ou 3 e 4, gerando uma proteína de 210 Kd. Os pontos de ruptura no cromossomo 9 estendem-se por uma região de mais de 200 kb na extremidade 5' do gene *abl*. Os exons 2 a 11 do *abl* estão sempre incluídos na seqüência genética translocada para o cromossomo 22 e os exons 1a e 1b podem ser incluídos ocasionalmente. Apesar de os éxons 1a e 1b poderem fazer parte do gene *bcr/abl* ao nível de DNA, eles são retirados no processo de formação do RNA mensageiro (mRNA), resultando num transcrito uniforme de 8,5 kb constituído dos éxons 2 a 11 do *abl* fundidos ao éxon 2 ou 3 do gene *bcr*, chamadas de translocações b2a2 ou b3a2, respectivamente (8). O gene quimérico está presente em células de linhagem granulocítica, megacariocítica, monocítica/macrofágica, eritrocítica (9); de forma menos freqüente em linfócitos B e alguns linfócitos T (10-12), porém não em fibroblastos de medula óssea (13).

Diagnóstico molecular

O gene quimérico *bcr/abl* serve como um marcador diagnóstico de LMC. O gene não forma parte do genoma normal e sua presença comprova a existência de malignidade. Da mesma forma como o cromossomo Filadélfia foi a primeira alteração cromossômica a ser relacionada ao câncer humano, a detecção de *bcr/abl* foi o primeiro diagnóstico molecular de neoplasias a ser desenvolvido.

Várias técnicas de análise molecular são capazes de detectar o cromossomo Filadélfia, como por exemplo "Southern blotting", "Northern blotting" e a PCR ("Polymerase Chain Reaction") com níveis diferentes de especificidade e sensibilidade.

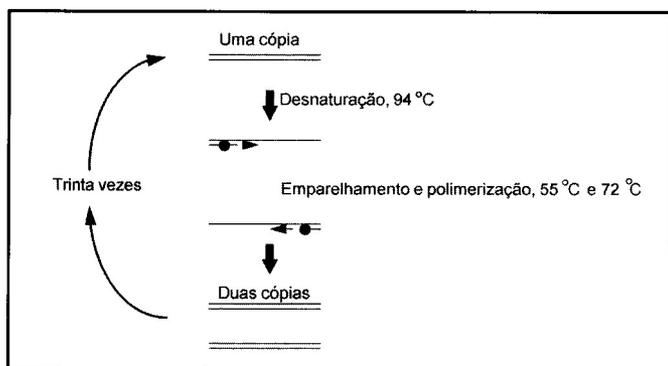


FIGURA 2: A reação em cadeia da polimerase (PCR)

Representação esquemática da PCR. A dupla fita do DNA alvo é inicialmente desnaturada por aumento da temperatura a 94 °C, com a redução da temperatura, os oligonucleotídeos iniciadores se emparelham à seqüência complementar no DNA alvo. A temperatura é, então, elevada a 72 °C, temperatura ótima de atividade da enzima DNA polimerase, que catalisa a polimerização do DNA. Este ciclo se repete 30 vezes, o que resulta na acumulação exponencial dos produtos.

A técnica de PCR, inicialmente descrita por Saiki et al. em 1985 (14-15) é a técnica molecular mais útil e é o foco da discussão deste trabalho.

A PCR é uma reação enzimática que amplifica determinados fragmentos de DNA numa forma altamente específica. Ela consiste basicamente de três passos que se repetem ciclicamente, como mostrado na figura 2: primeiro, desnaturação do DNA pelo calor, em fitas simples; segundo, o emparelhamento dos oligonucleotídeos iniciadores ("primers") às fitas de DNA nos segmentos específicos para iniciar o processo de cópia e, finalmente, extensão dos iniciadores através dos nucleotídeos e da polimerase termoestável, (figura 3) efetuando a cópia e duplicando os segmentos definidos do DNA (14). Este ciclo é repetido entre 25 e 40 vezes até que a amplificação atinja um plateau, onde tipicamente estão presentes um bilhão de cópias do fragmento amplificado. A PCR revolucionou o diagnóstico

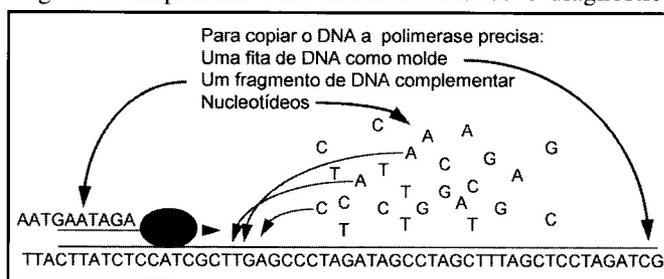


FIGURA 3: Atividade da DNA polimerase

A enzima DNA polimerase incorpora os nucleotídeos (A, G, T ou C), tendo como molde uma fita de DNA de fita simples. Os fragmentos recém-formados servirão de molde nos ciclos subsequentes.

molecular e as técnicas de DNA recombinante, permitindo a detecção e identificação de pequenos segmentos de DNA ou mRNA, oferecendo vantagens em relação à citogenética ou Southern blotting. No uso da PCR para o diagnóstico de LMC, emprega-se um iniciador complementar ao gene *bcr* (exon 1 ou 2) e o outro ao *abl* (exon 2 ou 3). Quando não existe o gene híbrido, os dois iniciadores se emparelham a genes diferentes, o que não resulta na amplificação de um fragmento de DNA. Por outro lado, quando está presente o gene híbrido *bcr/abl* os dois iniciadores se emparelham com o molde e produzem um fragmento de DNA amplificado detectável como uma banda em uma eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida, como mostra a figura 4 (16).

A PCR, como usada rotineiramente, tem a capacidade de amplificar fragmentos de DNA de até dois mil pares de bases. Avanços recentes aumentaram o tamanho do fragmento amplificável até cerca de 30.000 pb (17). Entretanto, o ponto exato da translocação no cromossomo Filadélfia em pacientes diferentes varia em até 200.000 pb. Um único par de iniciadores não seria capaz de amplificar o gene quimérico de todos os casos, impossibilitando o uso da PCR para o diagnóstico da doença através da detecção da translocação. Para superar este problema, uma modificação da PCR chamada RT-PCR ("Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction") é empregada. Neste caso,

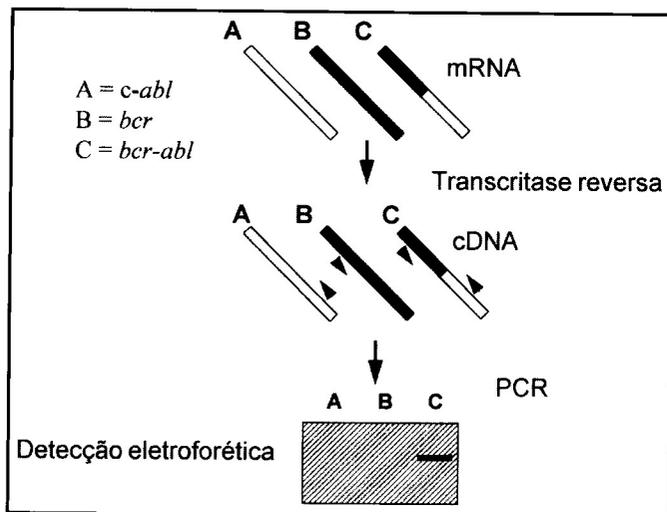


FIGURA 4: Detecção de t(9;22) por RT-PCR

Após o isolamento de mRNA, este é convertido em cDNA em reação catalisada pela enzima transcriptase reversa, sendo obtidos cDNAs, que podem ser do gene de fusão *bcr-abl*, (indicado como C) ou dos genes *bcr* (B) ou *c-abl* normal (A). Na reação de PCR, um dos iniciadores empregados (indicados como pontas de setas) é complementar a uma seqüência de DNA do gene *bcr* e o outro do gene *abl*. Somente haverá uma amplificação se houver a presença do gene híbrido, porque do contrário os iniciadores se emparelharão a genes diferentes. O produto amplificado pode ser detectado através de eletroforese em um gel de poliacrilamida.

em vez do DNA genômico, o mRNA serve como molde inicial da reação, sendo primeiro convertido em DNA complementar (cDNA) através da enzima transcriptase reversa (RT), como mostra a figura 4. O cDNA por sua vez serve como molde para a PCR. A vantagem desta metodologia é que a variabilidade do mRNA híbrido transcrito de *bcr/abl* é muito inferior à variabilidade do gene quimérico e um único par de iniciadores amplifica todos os casos. Para aumentar a sensibilidade da reação, permitindo a detecção de somente uma célula expressando *bcr/abl* em meio a 10^6 linfócitos normais, uma segunda modificação do protocolo pode ser usada. Nesta modificação, que se chama "nested" PCR, o produto da RT-PCR (amplificado pelos iniciadores 1 e 2 na figura 5) é reamplificado com um segundo par de iniciadores internos ao primeiro (mostrado na figura 5 como a amplificação com os iniciadores 3 e 4). O produto da PCR "nested" pode diferir em tamanho, conforme o paciente apresente translocações tipo b2a2 ou b3a2. A técnica de PCR quando realiza a amplificação do gene *bcr/abl* permite a detecção de uma só célula Ph+ em 10^3 a 10^6 células (16, 18, 19). Porém, quando realizada por "nested" PCR, detecta uma em 10^5 a 10^7 células (18, 19, 20, 21). Para se avaliar o quanto a PCR é mais sensível, basta comparar sua sensibilidade aos métodos até então disponíveis para o diagnóstico. A citogenética é capaz de detectar um mínimo de 5% de células Ph+, mas em 40% dos pacientes com LMC que possuem o rearranjo *bcr/abl* dá resultados negativos. O uso de sondas fluorescentes com seqüências de *bcr* ou *abl* (FISH) aumenta a sensibilidade de detecção para 1% a 2%, comparável ao Southern blotting (22).

Apesar da sensibilidade da PCR, algumas considerações devem ser feitas sobre as possibilidades de falsos negativos e positivos. Para evitar os falsos-positivos, medidas que evitem contaminação entre amostras diferentes, por controles positivos, ou de maneira mais importante, por DNA previamente amplificado, devem ser tomadas (23); além de se incluir um controle negativo sem DNA e uma amostra de DNA sabidamente negativa para a translocação *bcr/abl*. Quanto aos falsos-negativos, devem ser evitadas variações na eficiência de extração de RNA, transcrição reversa e amplificação do cDNA, e deve-se realizar a amplificação de uma seqüência de mRNA de controle, que pode ser o próprio gene *abl*, mostrado na figura 5 com os iniciadores 4 e 5. Deve-se sempre também incluir na reação um controle positivo, importante para saber se a sensibilidade desejada foi atingida.

Este protocolo diagnóstico baseado em "nested" RT-PCR provavelmente representa o procedimento mais complexo que atualmente é feito em laboratórios de patologia clínica. Apesar disso, já existem diversos centros que já oferecem o diagnóstico de LMC por RT-PCR em nosso meio. A figura 6 mostra exemplos de diagnósticos feitos por nós.

A tendência atual é que o diagnóstico por RT-PCR seja definitivo. Os estudos indicam que sangue periférico ou medula óssea podem ser utilizados para a pesquisa com resultados similares (16, 21, 24). Além de sua sensibilidade, a RT-PCR também detecta *bcr-abl* em casos com translocações complexas envolvendo mais de dois cromossomos ou quando não há translocação recíproca e assim o cromossomo 22 não exibe um tamanho diminuído. Estes casos não são diagnosticáveis por

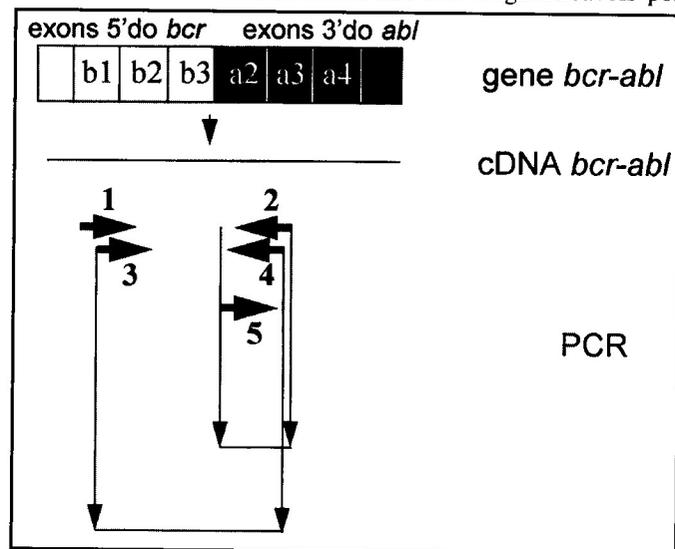


FIGURA 5: Diagnóstico molecular do bcr-abl

O modelo mostra o mRNA quimérico formado pela fusão dos genes *bcr-abl*, que é transcrito em cDNA. As setas indicam a posição dos iniciadores utilizados para o diagnóstico molecular da fusão *bcr-abl*. Os iniciadores 1 e 2 amplificam a partir do cDNA um fragmento que será reamplificado pelos iniciadores 3 e 4 na reação de "nested-PCR". Os iniciadores 2 e 5 amplificam um fragmento do gene *abl* normal, que serve como controle da eficiência da reação.

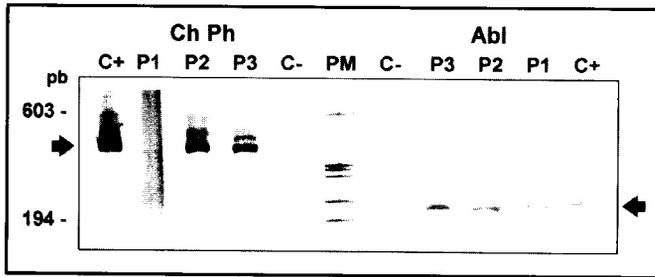


FIGURA 6: Diagnóstico da fusão *bcr-abl* por RT-PCR e "Nestled-PCR"
Gel de poliacrilamida a 7% corado com prata mostrando a detecção da amplificação por PCR do cDNA da fusão *bcr-abl* de 3 pacientes (P1 a P3), na metade esquerda do gel. Os pacientes 2 e 3 são positivos, enquanto paciente 1 é negativo. C+ e C- indicam os controles da reação, respectivamente, um paciente sabidamente positivo e um tubo sem DNA. A metade direita do gel mostra os produtos de PCR do gene *abl*, controle interno positivo. As setas indicam os produtos amplificados.

citogenética, sendo por isso que cerca de metade dos casos aparentemente negativos para *bcr-abl* à citogenética são positivos por RT-PCR (25). Mas 5% a 10% dos casos clinicamente diagnosticados como LMC são realmente negativos para o *bcr-abl*. Estes pacientes têm evolução clínica distinta daqueles com LMC *bcr-abl* positivo e possivelmente trata-se de uma forma variante de mielodisplasia ou de mieloproliferação (26). Por outro lado, a translocação *bcr-abl* também existe em outras formas de leucemia, tais como leucemia mielóide aguda e leucemia linfóide aguda, onde confere um prognóstico pior. Assim, o diagnóstico molecular tem que ser feito no contexto da análise citológica do paciente.

Evolução terapêutica da LMC

Com a aplicação das técnicas diagnósticas disponíveis conseguiu-se a análise da eficácia de drogas e abordagens terapêuticas existentes. Isto, aliado aos avanços farmacológicos, permitiu a evolução de um tratamento à base de bussulfan na década de 50 e, depois, no início dos anos 60 com hidroxiuréia para os tratamentos com alfa-interferon (a-IFN) e de transplante de medula óssea, considerado o tratamento de escolha hoje em dia. Passamos de um período em que a utilização, ora de um agente alquilante, ora de um antimetabólito, permitiu a conquista de um impacto positivo na história natural da doença, porém com raras respostas citogenéticas, para um período onde o foco do interesse está na integração ideal de esquemas terapêuticos para a obtenção de respostas citogenéticas duradouras e cura sempre que possível.

O tratamento com a-IFN induz respostas citogenéticas completas ou parciais, mas não cura a doença. Os primeiros estudos relatam índices de resposta hematológica completa de 70% e de resposta citogenética em torno de 40%, usando IFN humano parcialmente purificado (27). O uso de a-IFN recombinante 2a resultou em 57% - 75% de respostas hematológicas, sendo menos de 40% respostas citogenéticas completas (28). Não há evidências de que associação do tratamento de a-IFN e g-IFN melhora a

resposta terapêutica (29, 30-32). Porém, existe evidência de respostas mais satisfatórias quando a terapêutica com IFN é iniciada no primeiro ano do diagnóstico (27).

Três estudos de grande importância comprovam a eficácia relativa do tratamento com a-IFN 2a em comparação com a quimioterapia convencional, mostrando sobrevida mediana maior para o grupo tratado com IFN (30, 33, 34). Os resultados para os grupos tratados com a-IFN mostram uma sobrevida mediana de 63 a 72 meses contra 43 a 56 meses de sobrevida mediana em grupos tratados com bussulfan ou hidroxiuréia.

Os intervalos de sobrevida após tratamento com a-IFN enfatizam que a terapia resulta em remissão mas nunca em cura. Interessantemente, pacientes com remissões citogenéticas, mesmo parciais, persistem em remissão por longos períodos (25). Porém, ao analisar pacientes que apresentam remissões citogenéticas completas após o uso de IFN com a RT-PCR, observa-se que a maioria tem doença residual (19) que sugere efeito supressivo in vivo mediado pelo IFN provocando latência tumoral (35).

Os critérios de resposta à terapia com a-IFN para a LMC já estão bem definidos, e atualmente este tratamento é utilizado como primeira linha em pacientes em que o transplante de medula óssea (TMO) alogênico não é uma opção (14).

O TMO é considerado a única modalidade de tratamento curativo para LMC capaz de oferecer uma longa sobrevida livre de doença (SLD) (36, 37). O objetivo é erradicar o clone maligno com quimioterapia mieloablativa e radioterapia, e estabelecer a hematopoese normal através do transplante de células-tronco hematopoéticas normais de doadores. Além do regime de condicionamento, a transfusão de linfócitos do doador pode erradicar as células malignas que sobreviveram ao condicionamento, conferindo um efeito enxerto versus leucemia (38). A sobrevida livre de doença em cinco anos depende do estágio da doença no momento do transplante, sendo de 50%-60% quando o transplante for realizado na fase crônica, 30% na fase acelerada e 10%-20% na fase aguda. As taxas de recidiva são respectivamente menos de 20%, 40% e 60% (1, 37). A principal razão para a falha de tratamento nos estádios mais avançados é a recidiva, que ocorre entre seis meses e três anos após o transplante.

Durante a fase crônica acredita-se na obtenção de melhores índices de SLD se o TMO for realizado no primeiro ano após diagnóstico, com quase 80% de SLD, quando realizado no primeiro ano, contra 44% se realizado após esse período (39). Analisando-se os dados do Registro Internacional de TMO (IBMTR), observa-se uma vantagem de 10% nos pacientes transplantados logo após o diagnóstico (25, 40). O Registro Europeu de TMO (EBMTR) demonstra que o intervalo entre o diagnóstico e o transplante é um fator prognóstico independente (41). A idade e depleção de células T são fatores prognósticos importantes (42, 43). Os fatores prognósticos adversos incluem

tratamento prévio com bussulfan (40), evolução clonal (44) e mielofibrose (45).

Os diferentes regimes de condicionamento utilizados não têm impacto na SLD. Os esquemas mais utilizados são ciclofosfamida 60 mg/kg em dois dias consecutivos e TBI; bussulfan e ciclofosfamida; Etoposide e TBI, todos com sobrevidas medianas similares.

Apesar de ser uma única abordagem terapêutica capaz de oferecer cura da LMC na atualidade, a indicação do TMO deve ser criteriosa devido aos riscos inerentes ao tratamento. Um número substancial de pacientes com diagnóstico de LMC em fase acelerada ou blástica são curados por transplante alogênico (46-48), em comparação aos tratamentos convencionais com os quais se obtém resultados muito pobres (37). Neste grupo torna-se a única possibilidade curativa, apesar da morbimortalidade que está implícita no tratamento. Por outro lado, a indicação nos pacientes recém-diagnosticados deve considerar que este procedimento tem mortalidade na fase aguda de 20%-30%, em pacientes que têm expectativa mínima de sobrevida de três a quatro anos, aliado à probabilidade de o tratamento com a-IFN permitir uma remissão hematológica ou citogenética, além de não interferir de forma adversa no resultado do TMO (37, 49). Apesar de ser ainda um assunto controverso, normalmente indica-se TMO em pacientes no primeiro ano do diagnóstico, com idades abaixo de 50-55 anos e que possuam doadores HLA compatíveis. Quando um destes critérios não é preenchido, opta-se por iniciar terapêutica com a-IFN. Caso ocorra resposta citogenética parcial ou mínima em 12 meses, mantém-se o tratamento com a-IFN, a menos que ocorra progressão. Assim, nos pacientes que estão em fase crônica tardia e naqueles pacientes que não obtiveram resposta ao a-IFN se possível, indica-se TMO alogênico.

Quando não é possível realizar transplante alogênico, outras modalidades de tratamento têm sido examinadas. Algumas destas são o TMO alogênico com doadores não-relacionados, e o TMO autólogo. Mesmo quando ocorre recidiva após o primeiro transplante alogênico, estes pacientes podem ser resgatados com um segundo transplante, a-IFN ou transfusões de células mononucleares de doador.

O diagnóstico molecular para detecção de doença mínima residual após transplante

Com as perspectivas de tratamento em rápida e contínua expansão, a necessidade de detectar doença residual mínima é premente. Isso permitiria identificar aqueles pacientes com maior risco de recidiva, que se beneficiariam de tratamento adicional, sempre na busca de remissões mais prolongadas. Este objetivo é atingido com "nested" PCR, através da qual é possível a detecção de uma célula neoplásica em 10^6 - 10^7 células normais. Já está ficando claro que a aplicação do diagnóstico da DMR por RT-

PCR é de grande valor prognóstico. Estudos de seguimento de pacientes submetidos a TMO com o uso de PCR proporcionaram informações a respeito do comportamento desse teste nestes pacientes, e como ele deve ser analisado. Uma proporção significativa dos pacientes permanece, após transplante alogênico, com níveis detectáveis de *bcr-abl*, durante os primeiros meses, apesar de estarem em remissões citogenéticas e hematológicas (16, 20, 21, 50, 51, 52). Com o acompanhamento por PCR após o sexto mês, três subgrupos de pacientes puderam ser identificados: aqueles cuja PCR mantém-se persistentemente negativa após o período inicial; aqueles com PCR positiva de forma intermitente e outros com PCR sempre positiva, com estes três grupos apresentando probabilidades diferentes de permanecer em remissão pós-TMO (53, 54). Vinte a 40% dos pacientes que apresentam uma PCR positiva entre o sexto e décimo segundo mês após o transplante recidivam, em contraste com apenas 3% dos que permanecem PCR negativos nesse período. Quando há duas ou mais determinações positivas, o risco aumenta para 78% (55). Em intervalos maiores que 12 meses após o transplante, a negatividade por PCR praticamente exclui o risco de recidiva, e após três anos provavelmente significa cura (21). O grupo que apresenta resultados positivos por PCR de maneira intermitente também apresenta menor risco de recidiva em comparação com o grupo persistentemente positivo (8). A intermitência da positividade parece refletir uma menor quantidade de células Ph+, e assim, algumas vezes abaixo do limite de detecção da PCR.

Na experiência do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Depto de Oncologia Clínica do Hospital A.C. Camargo, entre dois pacientes que foram submetidos a transplante alogênico de medula óssea (com utilização de células progenitoras periféricas) por serem portadores de LMC, todos apresentaram negativação do cromossomo Ph, através de PCR, respectivamente três e seis meses após o procedimento.

O desenvolvimento de métodos de PCR quantitativa poderia ter maior valor preditivo de recidiva clínica que somente a PCR qualitativa, e seria útil para o acompanhamento dos pacientes persistentemente positivos. Os pacientes PCR positivos com quantidades crescentes de transcrito quimérico durante o acompanhamento estariam sob maior risco de recidiva, e seriam candidatos a tratamentos adicionais. Em contraste, pacientes com expressão estável ou decrescente de *bcr/abl* devem ter mecanismos imunológicos que suprimem o clone maligno, ou então este pode ter perdido a capacidade proliferativa, e portanto apresentam menor risco de recidiva. Dois estudos, utilizando técnicas de PCR quantitativa, conseguiram prever recidivas nos pacientes que apresentavam elevações nos níveis de expressão de *bcr/abl* (56). Lion e cols., baseados nestas observações, propuseram o termo de recidiva por PCR para indicar um aumento de dez vezes ou mais na expressão do mRNA da fusão *bcr/abl*, determinado por um mínimo de três análises consecutivas de PCR quantitativa (56).

O autor argumenta que o aumento de dez vezes ou mais na expressão relativa do gene *bcr/abl*, para diagnosticar a recidiva por PCR, leva em conta a inexatidão potencial inerente ao método e, assim, procura prevenir erros na interpretação de eventos como recidiva genética transitória, flutuações na expressão do gene marcador e contaminações da amostra. Nessa série, o tempo médio entre a elevação do mRNA de *bcr/abl* e os primeiros sinais de progressão citogenética ou hematológica foi de seis meses, tempo suficiente para permitir a intervenção terapêutica (55). O teste de PCR quantitativa fornece um parâmetro extremamente precoce e sensível para melhorar o manejo clínico dos pacientes portadores de LMC (56). Os métodos de PCR quantitativa, de extrema utilidade no manejo clínico dos pacientes com LMC sob tratamento medicamentoso ou após TMO, provavelmente estarão disponíveis em um futuro próximo para a aplicação em laboratórios clínicos.

Conclusão

O cromossomo Filadélfia foi a primeira alteração genética a ser associada consistentemente com câncer, e é uma das melhores entendidas ao nível molecular no presente. O resultado dos estudos da fusão *bcr/abl* ao nível molecular trouxe progressos para o desenvolvimento tanto de testes diagnósticos como de terapias. A detecção do gene quimérico constitui diagnóstico de certeza de LMC. O tratamento da LMC com TMO e IFN tornou possível a erradicação total ou parcial das células Ph+, e a detecção de doença residual mínima tornou-se imprescindível e perfeitamente possível com os métodos disponíveis atualmente. Essa sintonia entre a ciência e a aplicação clínica do conhecimento acumulado deve servir de protótipo para o entendimento das bases moleculares e provavelmente terá um grande impacto no manejo terapêutico futuro de outros tumores.

Summary

Chronic myeloid leukemia (CML) is genetically characterized by the presence of the fusion of the bcr/abl genes, which results from reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22. The chimeric bcr/abl transcript, which encodes a protein with enhanced tyrosine kinase activity, appears to be essential for the maintenance of malignancy. Detection of the bcr/abl transcript by the Polymerase Chain Reaction (PCR) thus offers a sensitive, rapid and highly specific technique for diagnosis of CML. The once invariably fatal disease is now potentially curable by allogeneic bone marrow transplantation (BMT). The success of treatment in individual cases is monitored by PCR detection of residual malignant cells. Individuals with no detectable tumor cells 6 months - 1 year after transplantation have very low probability of relapse. Those who have detectable tumor cells at two time point have higher risk of relapse indicating that additional therapy is appropriate. In this article, we review clinical, cytogenetic and molecular aspects of CML and explore the co-evolution of anti-CML and laboratory diagnosis.

Referências bibliográficas

- Morrison VA. Chronic leukemias. CA Cancer J Clin 1994; 44: 353-77.
- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132: 1497-9.
- Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 1973; 243: 290-3.
- Senechal K, Sawyers CL. Signal transduction-based strategies for the treatment of chronic myelogenous Leukemia. Mol Med Today 1996; 2:503-9.
- Gishizky ML, Witte ON. Initiation of dysregulated growth of multipotent progenitor cells by *bcr/abl* in vitro. Science 1992; 256: 836-9.
- Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous Leukemia in mice by the P210 *bcr/abl* gene of the Philadelphia chromosome. Science 1990; 247: 824-30.
- Witte ON. Closely related *bcr/abl* oncogenes are associated with the distinctive clinical biologies of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous and acute lymphocytic leukemia. Curr Top Microbiol Immunol 1988; 141: 42-9.
- Pichert G, Ritz J. Clinical significance of *bcr/abl* gene rearrangement detected by the polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous Leukemia. Leukemia Lymphoma 1993; 10:1-8.
- Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou TH. Chronic myelogenous leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. Am J Med 1977; 63: 125-30.
- Bakhshi A, Minowada J, Arnold A, et al. Lymphoid blast crises of chronic myelogenous leukemia represent stages in the development of B cell precursors. N Engl J Med 1983; 309:826-31.
- Jonas D, Luebbert M, Kawasaki ES, et al. Clonal analysis of *bcr/abl* rearrangement in T lymphocytes from patients with chronic myelogenous leukemia. Blood 1992; 79:1017-23.
- Bartram CR, Raghavachar A, Anger B, et al. T lymphocytes lack rearrangement of the *bcr* gene in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. Blood 1987; 69:1682-5.
- Greenberg BR, Wilson FD, Woo L, et al. Cytogenetic of fibroblastic colonies in Ph- positive chronic myelogenous leukemia. Blood 1978; 1: 1039-42.
- Saiki RK, Scharf SJ, Faloone FA. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350-4.
- Mullis KB, Faloone FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987;155:335-50.
- Roth MS, Antin JH, Bingham EL, et al. Detection of Philadelphia chromosome positive cells by the polymerase chain reaction following bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. Blood 1989; 74:882-5.
- Barnes WM. Polymerase chain reaction amplification of up to 35 kb with high fidelity and high yield from 1 bacteriophage templates. Proc Natl Acad Sci 1994; 91:2216-20.
- Bilhau-Nabera C, Viard F, Marit G, et al. Complete cytogenetic conversion in chronic myelogenous leukemia patients undergoing interferon a therapy: follow-up with polymerase chain reaction. Leukemia 1992; 6: 595-8.
- Dhingra K, Kurzrock R, Kantarjian H, et al. Minimal residual disease in interferon treated chronic myelogenous leukemia: results and pitfalls of analysis based on polymerase chain reaction. Leukemia 1992; 6:754-60.
- Miyamura K, Tahara T, Tanimoto M, et al. Long persistent *bcr/abl* positive transcript detected by polymerase chain reaction after marrow transplant for chronic myelogenous leukemia without clinical relapse: a study of 64 patients. Blood 1993; 81:1089-93.
- Hughes TP, Morgan GJ et al. Detection of residual leukemia after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: role of polymerase chain reaction in predicting relapse. Blood 1991; 77: 874-8.
- Westbrook CA. The role of molecular techniques in the clinical management of

- leukemia. *Cancer* 1992; 70:1695-700.
23. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with polymerase chain reaction. *Nature* 1989; 339: 237-8.
24. Stamminger G, Przybilla D, Schultze W, et al. Detection of residual bcr/abl mRNA by polymerase chain reaction in chronic myelogenous leukemia after stem cell transplantation. In: *Molecular Biology of Hematopoiesis, 8th Symposium*. July 9-13, Basel, 1993. p187. (abstracts).
25. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, et al. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood* 1993; 3:691-703.
26. Hochhaus A, Reiter A, Skladny H et al. A novel bcr/abl fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome negative chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1996; 88:2236-40.
27. Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie KB et al. Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1987; 69:1280-8.
28. Talpaz M, Kantarjian HM, Kurzrock R, et al. Interferon alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia Philadelphia chromosome-positive patients. *Ann Intern Med* 1991; 114:532-8.
29. Yahalom J. Oncologic emergencies. In: De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia: J B Lippincott; 1993. p. 1971-8.
30. Alimena G, Morra E, Lazzarino M, et al. Interferon alpha 2b as therapy for Ph1-positive chronic myelogenous leukemia: a study of 82 patients treated with intermittent or daily administration. *Blood* 1988; 72: 642-7.
31. Ozer H, Mick R, Testa J, et al. Subcutaneous alpha-interferon shows substantial activity in untreated chronic phase Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1988; 7: A 684.
32. Ozer H. Biotherapy of chronic myelogenous leukemia with Interferon. *Semin Oncol* 1988;15: 14-20.
33. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon 2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. *N Engl J Med* 1994; 330: 820-7.
34. Niederle N, Kloke O, Wandl UB, et al. Long term treatment of chronic myelogenous leukemia with different Interferons: Results from three studies. *Leukemia Lymphoma* 1993; 9:111-9.
35. Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian H, et al. Persistence of dormant leukemic progenitors during interferon induced remission in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 1994; 94:1383-9.
36. Wagner JE, Zahurak M, Piantodosi S, et al. Bone marrow transplantation of chronic myelogenous leukemia in chronic phase: evaluation of risks and benefits. *J Clin Oncol* 1992; 10: 779-89.
37. Armitage JO, Antman KH. *High dose cancer therapy pharmacology, hematopoiesis, stem cells*. Maryland: Williams & Wilkins; 1995.
38. Drobyski WR, Keever CA, Roth MS et al. Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose. *Blood* 1993; 82: 3210-8.
39. Storb R, Deeg HJ, Pepe M, et al. Methotrexate and cyclosporin alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients given HLA-identical marrow grafts for leukemia: long term follow-up of a controlled trial. *Blood* 1989; 73:1729-34.
40. Goldman J, McGlave P, Szydlo R, et al. Impact of disease duration and prior treatment on outcome of bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1992; 6: 473.
41. Gratwohl A, Hermans J, Niederweiser D, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: long-term results. *Bone Marrow Transplant* 1991; 12:509-16.
42. Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplantation Registry: report from the International Bone Marrow Transplantation Registry. *Bone Marrow Transplant* 1989; 4: 221-5.
43. McGlave PB. Therapy of chronic myelogenous leukemia with related or unrelated donor bone marrow transplantation. *Leukemia* 1992; 6:115-9.
44. Przepiorka D, Thomas ED. Prognostic significance of cytogenetic abnormalities in patients with Chronic Myelogenous Leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1988; 3:113-9.
45. Rajantie J, Sale GE, Deeg HJ, et al. Adverse effect of severe marrow fibrosis on hematological recovery after chemoradiotherapy and allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood* 1986; 67:1693-7.
46. Thomas ED, Clift TA. Indications for marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1989; 73:861-4.
47. Champlin RE, Goldman JM, Gale RP. Bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 1988; 25:74-80.
48. Snyder DS, McGlave PB. Treatment of chronic myelogenous leukemia with bone marrow transplantation. *Hematol Oncol North Am* 1990; 4:535-7.
49. Giralt SA, Kantarjian HM, Talpaz M, et al. Effect of prior interferon a therapy on the outcome of allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 1993; 11:1055-61.
50. Pichert G, Alyea EP, Soiffer RJ, et al. Persistence of myeloid progenitor cells expressing bcr/abl mRNA after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 84:2109-14.
51. Okamoto R, Harano H, Matsuzaki M, et al. Predicting relapse of chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation by bcr/abl mRNA and DNA fingerprinting. *Hemopathology* 1995; 104:510-6.
52. Miyamura K, Tanimoto M, Morishima Y, et al. Clinical significance of minimal residual disease detected by polymerase chain reaction after bone marrow transplantation for all; comparison with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1990; 76: 555-9.
53. Pichert G, Denis-Claude R, Gonin R, et al. Distinct patterns of minimal residual disease associated with graft - versus - host disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 1995; 13:1704-13.
54. Roth MS, Antin JH, Ash R, et al. Prognostic significance of Ph chromosome positive cells detected by the polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1992; 79:276-82.
55. Radich JP, Gehly G, Gooley T et al. Polymerase chain reaction detection of bcr-abl fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid-leukemia: results and implications in 346 patients. *Blood* 1995; 85:2632-5.
56. Lion T. Clinical implications of qualitative and quantitative polymerase chain reaction analysis in the monitoring of patients with chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14:505-9.