

Artigo / Article

Avaliação do valor prognóstico da detecção do *status* quimérico de pacientes após o transplante alogênico de células progenitoras hematopoéticas

Evaluation of prognostic importance of the detection of chimerical status in post-allogeneic progenitor cell transplantation patients

Neide Bueno¹Rosana A. Silveira²Ederson R. Mattos³Vergílio A. R. Colturato³Maria Inês de M. C. Pardini⁴

Este trabalho teve por objetivo correlacionar o status quimérico de pacientes pós-TCPH alogênico com parâmetros clínicos, para avaliar o valor preditivo dos achados laboratoriais de quimerismo. Amostras de sangue de 98 pacientes (67 em seguimento e 31 novos casos) foram submetidas à análise do status quimérico pós-TCPH. Os "loci" analisados por biologia molecular foram CS1PO, TPOX, F13A1, FESFPS, HUMTH01, VWA, SE33, HUMARA, HUMD21S11 e Amelogenina. Precocidade da evidência laboratorial de quimerismo misto (QM), em relação ao aparecimento dos sintomas clínicos de recaída, foi observada em 9 dos 12 pacientes nas LA, ou seja, nesses casos, a primeira manifestação de QM foi detectada pelo exame laboratorial antes de qualquer evidência citológica ou clínica de recaída. Em todos eles, houve uma mudança terapêutica relacionada com esse momento do aparecimento do QM. Em 100% dos pacientes com QM na LMC, a detecção do quimerismo pelo exame laboratorial foi anterior a qualquer evidência citológica ou clínica de recaída. De uma maneira geral, o exame laboratorial da avaliação do status quimérico pós-TCPH alogênico pela análise dos "loci" hipervariáveis do genoma, mostrou ser um exame sensível, com detecção de até 1% de QM e precoce, visto que, muitas vezes, foi a primeira manifestação de doença residual antes de qualquer evidência citológica ou clínica da mesma. A associação da existência de QM e a recaída clínica e/ou óbito fica mais evidente nos casos de LA do que nos casos de LMC e AAS. Rev. bras. hematol. hemoter. 2008;30(3):177-180.

Palavras-chave: Quimerismo misto (QM); STR-PCR; transplante de células progenitoras hematopoéticas.

Introdução

Nos últimos trinta anos, o transplante de células progenitoras hematopoéticas (TCPH) vem sendo utilizado como procedimento terapêutico tanto no tratamento de doenças malignas e não malignas, bem como nas imunodeficiências, erros inatos do metabolismo e nos pacientes portadores de tumores sólidos. Sua finalidade é corrigir de-

feitos quantitativos e qualitativos, restituindo a hematopoese normal.^{1,2,3}

A conversão do padrão hematopoético do receptor para o do doador após o TCPH alogênico é conhecido como "pega". O sucesso ou falha da "pega" pode ser avaliado através da investigação da origem das células hematopoéticas do receptor. A técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction) tem sido utilizada para análises de *loci* hipervariáveis do

¹Bióloga. Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica, Curso de Mestrado Profissional do Hemocentro da Faculdade de Medicina, Unesp – Botucatu-SP.

²Bióloga. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, SP.

³Médico do Serviço Cooperativo do Hemocentro de Botucatu/Hospital Dr. Amaral Carvalho de Jaú para o TMO.

⁴Pesquisadora responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Faculdade de Medicina – Unesp – Botucatu-SP.

Correspondência: Maria Inês de Moura Campos Pardini
Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, Faculdade de Medicina – Unesp
18618-000 – Botucatu-SP – Brasil
Tel.:/Fax.: (14) 3811-6041
E-mail: inespardini@gmail.com

genoma, com o intuito de definir o quimerismo após o TCPH.

A detecção de células hematopoéticas somente do doador é denominada como quimerismo completo (QC). Quando há uma mistura de células hematopoéticas do doador e do receptor, detectadas a partir de 14 dias do TCPH, tem-se um quimerismo misto (QM).⁴⁻⁸ Estudos sugerem que a volta progressiva de células do receptor freqüentemente prediz recaída.^{5,9,10}

Este trabalho teve por objetivo correlacionar o *status* quimérico de pacientes após TCPH alogênico com parâmetros clínicos, para avaliar o valor preditivo dos achados laboratoriais de quimerismo.

Casuística e Método

Foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Faculdade de Medicina – Unesp – Botucatu, a avaliação do *status* quimérico pós-TCPH alogênico de 98 pacientes, sendo 55 do sexo masculino e 43 do sexo feminino. Deste total, 67 estavam em seguimento e 31 eram novos casos com seus respectivos doadores, atendidos pelo Serviço Cooperativo, Hemocentro de Botucatu/Hospital Dr. Amaral Carvalho de Jaú, para o TCPH, estado de São Paulo. Este trabalho teve parecer favorável do Comitê de Ética da Fundação Hospital Dr. Amaral Carvalho.

Quanto à patologia apresentada, 56 pacientes eram portadores de leucemias agudas (LA) (40 com leucemia mielóide aguda (LMA), 14 com leucemia linfóide aguda (LLA) e dois com leucemia bifenotípica); 29 pacientes apresentavam leucemia mielóide crônica (LMC); dez pacientes eram portadores de anemia aplásica severa (AAS) e três portadores de outras doenças.

A avaliação foi realizada tanto para a identificação dos *loci* informativos (padrões contrastantes entre doador e receptor), quanto para a análise do quimerismo após TCPH-alogênico. Para tal procedimento foram coletadas amostras de sangue periférico (SP) e, em alguns casos, amostras do aspirado da MO em EDTA, nos períodos pré e pós-TCPH. Quando não foi possível obter o padrão pré-transplante do paciente, foi realizada a coleta de células da mucosa bucal ou do bulbo capilar para a extração do DNA, utilizando-se a metodologia padronizada por Barea, 2000.¹¹ A extração de DNA foi realizada por metodologia *salting-out*.¹²

Para realização da PCR foi utilizado um par diferente de *primers* (iniciadores) referente ao *locus* de interesse, sendo um de cada par marcado com fluoresceína Cy 5. O volume final da reação foi de 50 µL contendo 1 X PCR Buffer [60mM Tris-SO₄, 18mM (NH₄)₂SO₄]; 2mM de MgSO₄; 200 µM de cada um dos dNTPs; 0,2 µM de cada *primer* e 1,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen®). Após o preparo desse mix acrescentaram-se 250 ng de DNA. Para a amplificação desses fragmentos, foi utilizado o termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA), com a seguinte programação: desnaturação inicial de 94 °C por 45 seg, seguida de 35 ciclos (94 °C por 30 seg, 56°C por 30 seg, 68°C por 1 min) e uma extensão final de 68 °C por 5 min. Para a amelogenina, a programação utilizada foi desnaturação inicial a 94 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos (94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C 1 min) e uma extensão final de 72 °C por 10 min. A localização cromossômica, o tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb), bem como a seqüência dos *primers*, estão listados na Tabela 1.

O produto da PCR foi então mantido a -20 °C, seguindo-se a separação dos fragmentos por eletroforese de alta resolução, no seqüenciador ALFexpress (Amersham Biosciences®), utilizando-se gel de poli-acrilamida a 8% e uréia 7M, em tampão TEB 0,6X.

Os resultados gráficos foram apresentados em forma de picos que corresponderam aos alelos do receptor e do doador. A análise do tamanho desses fragmentos, em pares de bases (pb), foi utilizada para identificar o polimorfismo

Tabela 1. Descrição dos *loci* utilizados na análise do *status* quimérico: tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb), localização cromossômica e seqüência dos *primers*. Os *primers* "A" foram marcados com Cy 5

Locus	Tamanho (pb)	Localização cromossômica	Seqüência dos <i>primers</i>
CSF1PO*	281-291	5q33.3-34	A -5'-AACCTGAGAGTCTGCCAAGGACTAG'-3' B -5'-TTCCACACACCACTGGCCATCTTC -3'
TPOX*	102-220	2p23-2pter	A -5'- ACTGGCACAGAACAGGCACTTAGG -3 B -5'- GGAGGAACTGGGAACCACACAGGT -3"
F13A1*	179-279	6p24-p25	A -5'- GAGGTTGCACTCCAGCTTT -3' B -5'- ATGCCATGCAGATTAGAAA-3'
FES/FPS*	138-206	15q25-qter	A -5'- GGGATTTCCCTATGGATTGG -3' B -5'- GCGAAAGAATGAGACTACAT -3'
HUMTH01*	146-171	11p15 -15.5	A -5'- GTGGGCTAAAAGCTCCCATTAT -3' B -5'- ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG -3'
VWA*	122-152	12p12-pter	A -5'- CCCTAGTGGATAAGAATAATC-3' B -5'-GACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG -3'
SE33*	222-339	5q14.1	A -5'-AATCTGGGCGACAAGAGTGA-3' B -5'-ACATCTCCCCTACCGCTA-TA -3'
HumARA*	255-315	Xcen-q13	A -5'- GCTGTGAAGGTTGCTGTTCAT -3' B -5'- TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3'
HumD21s11*	186-202	21q 21.1	A -5'- GTGAGTCAATTCCCAAG-3' B -5'- GTTGTATTAGTCAATGTTCTC-3'
AMEL*	107-113	X: p22-1-22.3; Y: p11.2	A -5'- CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG -3' B -5'- ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG -3'

*Descrição dos *primers* de acordo com as seqüências contidas no *web site* www.cstl.nist.gov/div831/strbase/str - acesso em 06/08/05

entre os indivíduos. Um *locus* foi considerado informativo quando pelo menos um alelo do padrão pré-transplante do receptor diferiu do doador, classificando o receptor portador de quimerismo misto (QM) ou quimerismo completo (QC). Foi adotado o critério de no mínimo dois *loci* informativos para definir o *status* quimérico como misto. A área sob a curva definida pelos picos foi calculada para quantificar o quimerismo.

Para os casos que apresentaram quimerismo misto (QM) crescente ou decrescente, foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: tipos de doença, mudança da terapia instituída, recidiva clínica e óbito.

Resultados/Discussão

Do total dos pacientes analisados, 20 apresentaram quimerismo misto (QM) em alguma fase após o TCPH, sendo 12 (60%) portadores de LA, cinco (25%) portadores de LMC e três (15%) com AAS.

No grupo das LA, os 12 pacientes que apresentaram QM pelo achado laboratorial foram submetidos a alterações da terapia instituída (redução de imunossupressão, submissão a um segundo transplante ou quimioterapia). Desses 12 pacientes, oito apresentaram QM crescente a cada exame laboratorial (Figura 1) e tiveram recidiva clínica, sendo que sete foram a óbito, ou seja, 58% do total com QM nas LA. Os quatro pacientes que apresentaram QM decrescente apresentaram remissão clínica e permaneceram vivos até o final do estudo.

Nas leucemias agudas, os exames laboratoriais tiveram alto valor preditivo de remissão, recidiva ou óbito, dados consistentes com a literatura.^{5,6,9}

No grupo dos pacientes com LMC, observamos que dos cinco pacientes que apresentaram QM, todos tiveram mudança de terapia (redução de imunossupressão, dois deles tiveram introdução de terapia com Glivec®). Os três pacientes do grupo da LMC em crise blástica apresentaram QM crescente, sendo observada recidiva em um paciente. Dois pacientes em fase crônica apresentaram QM decrescente, sendo observado um paciente com remissão. Do total dos pacientes do grupo da LMC com QM, dois tiveram recidiva e três remissão clínica; todos permaneceram vivos até o final do estudo.

Desta forma, o QM nos pacientes do grupo da LMC esteve relacionado com mudança terapêutica em 100% dos casos, com nenhum óbito e com índice de recaída de 40%.

Quanto aos pacientes portadores de AAS, observou-se que a presença de QM não alterou a conduta terapêutica, não esteve associada a um aumento das recidivas clínicas ou óbitos. Estes dados são conflitantes com a literatura,^{13,14} os quais correlacionam o QM com a perda do enxerto e recidiva clínica.

Nestes casos, as análises poderiam se restringir ao final do primeiro ano de tratamento, para monitorar a retirada da imunossupressão.

A precocidade da evidência laboratorial de QM (crescente ou decrescente) em relação ao aparecimento dos sintomas clínicos de recaída foi observada em 9 dos 12 pacientes

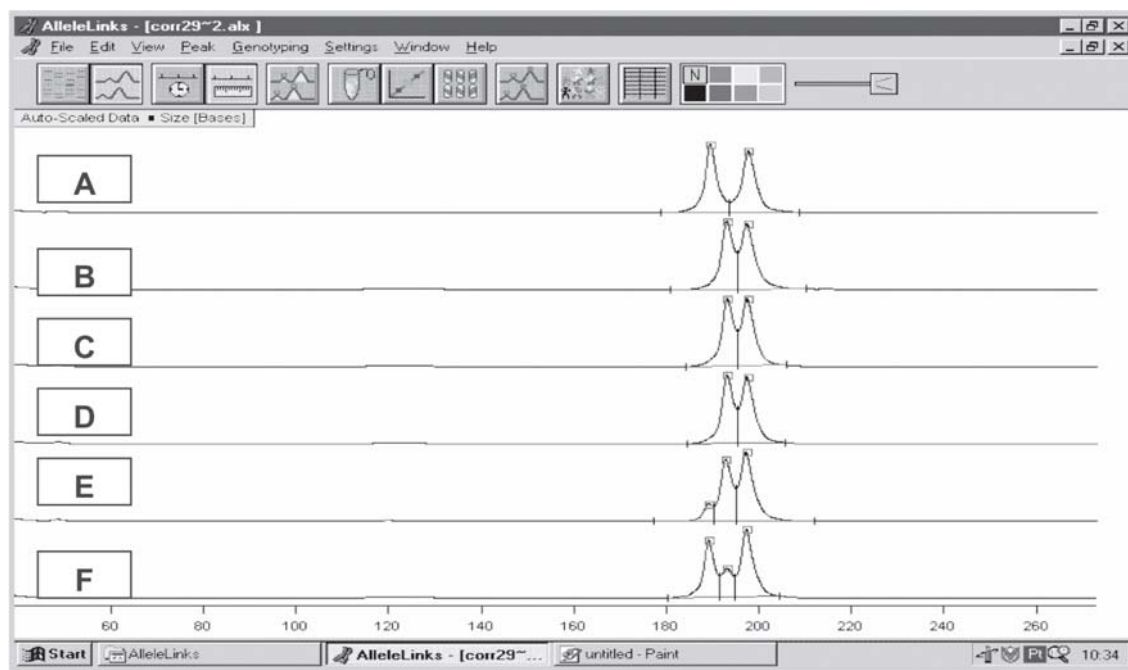


Figura 1. Exemplo de um caso de quimerismo completo progredindo para quimerismo misto crescente, (A) Receptor Pré-TCPH; (B) Doador; (C) Receptor D+30; (D) Receptor D+ 60; (E) Receptor D+120; (F) Receptor D+180

nas LA, ou seja, nesses casos, a primeira manifestação de QM foi detectada pelo exame laboratorial, antes de qualquer evidência citológica ou clínica de recaída. Em todos eles houve uma mudança terapêutica relacionada com esse momento do aparecimento do QM.

Em todos os pacientes com QM na LMC, a detecção do quimerismo pelo exame laboratorial foi anterior a qualquer evidência citológica ou clínica de recaída.

De uma maneira geral, o exame laboratorial da avaliação do *status* quimérico pós-TCPH alogênico pela análise dos *loci* hipervariáveis do genoma mostrou ser um exame sensível e precoce para detecção de quimerismo.

Abstract

This study aimed to correlate the chimerical status in post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) patients to clinical patterns in order to evaluate the predictive value of chimerism laboratorial findings. Blood samples from 98 patients (67 current and 31 new cases) were submitted to post-HSCT chimerical status analysis. The CS1PO, TPOX, F13A1, FESFPS, HUMTH01, VWA, SE33, HUMARA, HUMD21S11 and Amelogenian loci were analyzed. Precocity of Mixed Chimerism (MC) laboratorial evidence in relation to recurrent clinical symptom manifestations was observed in 9 out of 12 patients in AL, i.e., in these cases the first MC manifestation was detected in laboratory tests before any cytological or clinical evidence. In all cases, there was a therapeutic change due to MC onset. Chimerism detection through laboratorial examinations was prior to any cytological or clinical evidence in 100% of patients presenting MC in CML. Considering that it was the first manifestation of residual disease, before any cytological or clinical manifestation, laboratorial examination to evaluate chimerical status in post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation through analysis of genome hyper-variable loci, turned out to be a more sensitive examination and presented a detection rate of up to 1% for early MC. The association of MC to clinical recurrence and/death is more evident in AL cases than in CML and SAA. Rev. bras. hematol. hemoter. 2008;30(3):177-180.

Key words: Chimerism; STR-PCR; hematopoietic progenitor cell transplantation.

- Choi SJ, Lee KH, Lee JH, et al. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26(3):327-32.
- Nuckols JD, Rasheed BK, McGlennen RC, Bigner SH, Stenzel TT. Evaluation of an automated technique for assessment of marrow engraftment after allogeneic bone marrow transplantation using a commercially available kit. *Am J Clin Pathol.* 2000;113(1):135-40.
- Petz LD, Yam P, Wallace RB, et al. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood.* 1987;70(5):1331-7.
- Pindolia K, Janakiraman N, Kasten-Sportes C, et al. Enhanced assessment of allogeneic bone marrow transplant engraftment using automated fluorescent-based typing. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24(11):1235-41.
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet.* 1991;49(4):746-56.
- Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, et al. Serial and quantitative analysis of hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21(5):487-95.
- Barea JA, Pardini MIMC, Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2004;26(4):274-81.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
- Gomez JR, Garcia MJ, Serrano J, Sanchez J, Falcon M, Castillejo JA, et al. Chimerism analysis in long-term survivor patients after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Haematologica.* 1997;82(5):588-91.
- Hoelle W, Beck JF, Dueckers G, Kreyenberg H, Lang P, Gruhn B, et al. Clinical relevance of serial quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(2):219-23.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 13/03/2007

Aceito após modificações: 29/10/2007

Referências Bibliográficas

- Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Fundamentos e biologia do transplante de células hematopoéticas. In: *Hematologia: Fundamentos e Prática.* São Paulo: Atheneu; 2004.
- Anelli A. Transplante de medula óssea, citado em 05 abril 2004. Disponível em <http://www.Hospitaldocancer.com.btml>. Acesso em 05.abr.2004.
- Kirby SL. Bone marrow: target for gene transfer, citado em 26 janeiro 2005. Disponível em: <http://www.periodicos.capes.gov.br>.
- Ugozzoli BL, Yam P, Petr LD et al. Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genoma for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation. *Blood.* 1991;77(7):1607-15.