

Artigo / Article

Papel da P190^{BCR-ABL} como parâmetro de recaída na leucemia mielóide crônica

P190^{BCR-ABL} role in myeloid chronic leukemia relapse

Gabriela V. Andrade

*A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma desordem hematológica mieloproliferativa clonal causada por uma mutação em uma célula-tronco pluripotente, resultando na proliferação e acúmulo de células mielóides e seus progenitores. O cromossomo Philadelphia é o resultado de uma translocação recíproca de material genético entre os genes *abl* (Abelson murine leukemia) no cromossomo 9, e o *bcr* (breakpoint cluster region) no cromossomo 22, resultando na formação do gene quimérico BCR-ABL. Neste trabalho, 45 pacientes foram acompanhados de forma seqüencial, de acordo com as avaliações periódicas individuais, e 360 amostras foram selecionadas e analisadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) através da técnica qualitativa para as isoformas características da P210^{BCR-ABL} (b3a2 e b2a2) e P190^{BCR-ABL} (e1a2). No nosso estudo no pré-TMO, observou-se uma prevalência das isoformas características da LMC (b3a2 e/ou b2a2), fato imprescindível para que o paciente fosse acompanhado dentro do protocolo da LMC. A isoforma e1a2, característica da LLA, foi detectada em 11 pacientes em conjunto com essas isoformas. A detecção do transcrito e1a2 foi avaliada quanto ao seu provável papel na LMC, e foi um dos parâmetros de avaliação deste estudo. Rev. bras. hematol. hemoter. 2008;30(4):297-302.*

Palavras-chave: Leucemia; leucemia-pesquisa; leucemia mielóide crônica; reação em cadeia da polimerase; tirosinas quinases.

Introdução

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação clonal de células mielóides, resultado da transformação maligna de uma célula-tronco pluripotente (*stem cell*). É caracterizada em 95% dos casos pela presença de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, que resulta em um cromossomo marcador chamado "Philadelphia" (Ph1). Devido ao fenômeno de edição do RNA, transcritos de fusão envolvendo éxons diferentes do gene BCR podem ser formados, sendo os principais do tipo b2a2 e b3a2, originando uma proteína quimérica de 210 Kd (P210^{BCR-ABL}).^{1,2}

Recentemente foi descrita a presença do transcrito p190^{BCR-ABL} em baixos níveis no momento do diagnóstico em pacientes com LMC M-bcr p210^{BCR-ABL}. O fato da quantidade da p190^{BCR-ABL} parecer estar relacionada com a da

p210^{BCR-ABL}, levantou a hipótese de que a detecção do transcrito p190^{BCR-ABL} durante o acompanhamento do paciente estaria relacionada com um aumento de carga tumoral durante a evolução da doença, enquanto o paciente permanece em remissão. Portanto, pensou-se na utilização da presença de p190 como marcador de recaída.^{2,3,4}

Este trabalho realizou um estudo prospectivo da co-expressão dos transcritos p210^{BCR-ABL} e p190^{BCR-ABL}, mediante RT-PCR qualitativa, com o objetivo de validar a forma e o significado clínico da utilização destes marcadores em conjunto.

Foi desenvolvida uma abordagem molecular com significado na tomada de decisões terapêuticas precoces frente às situações de recaída através da análise da cinética do clone leucêmico através da mudança nos níveis e padrões de expressão do gene BCR-ABL ao longo do acompanhamento dos pacientes.

Universidade Federal Fluminense e Instituto Nacional de Câncer/RJ.

Correspondência: Gabriela Vasconcelos de Andrade
Av. Gov Juvenal Lamartine, 978 – bloco C/apto. 201 – Tirol
59022-020 – Natal-RN – Brasil
Tel.: 55 84 32210631 / 55 84 91065200
E-mail: gabyuri2401@yahoo.com.br

Casuística e Método

Foram estudados 45 pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) antes e após o transplante de medula óssea, no Centro Nacional de Transplante de Medula Óssea do Instituto Nacional de Câncer/RJ. Coletaram-se amostras de medula óssea ou sangue periférico (5 mL) pré-transplante e a cada trinta dias até 360 dias após o TMO.

Os procedimentos realizados foram a detecção qualitativa do gene quimérico BCR-ABL para as isoformas b3a2, b2a2 e e1a2 por RT-PCR multiplex e nested.

Foram realizados os seguintes procedimentos:

- Isolamento de RNA – Isolamento de células mononucleares de medula óssea ou de sangue periférico através de centrifugação em gradiente de Ficoll®

- Síntese de DNA complementar (c-DNA) – O c-DNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total em uma reação contendo oligonucleotídeos randômicos e a enzima transcriptase reversa (Superscript TM, Gibco BRL). Controles apropriados foram incluídos para descartar falsos positivos ou negativos.

- PCR Qualitativo Multiplex – Foi realizada uma primeira amplificação com vários pares de oligonucleotídeos iniciadores a fim de se detectarem as isoformas caracterizadas como b3a2, b2a2 (p210) e e1a2 (p190). O gene BCR normal foi amplificado como controle do procedimento de extração de RNA e de transcrição reversa. O PCR Multiplex permite detectar aproximadamente uma célula tumoral em 10³ células normais.

- PCR em ninho (Nested - PCR) – Uma segunda abordagem para amplificar RNAm em baixos níveis (negatividade no Multiplex) foi realizada em reações de duas etapas utilizando-se *primers* internos na segunda etapa, com uma sensibilidade de 1 x 10^{-5/6}.

Resultados

O estudo das amostras dos pacientes teve início em agosto de 2001 e se estendeu até dezembro de 2003. Neste trabalho, 45 pacientes foram acompanhados de forma seqüencial de acordo com as avaliações periódicas individuais. Foram obtidas 573 amostras totais; destas, 213 foram excluídas.

O protocolo dos acompanhamentos foi estabelecido com uma periodicidade trimestral. Alguns pacientes não obedeceram ao critério de acompanhamento padronizado, tendo sido as amostras referentes a estes pacientes excluídas.

As 360 amostras selecionadas foram analisadas por PCR através da técnica qualitativa para as isoformas características da P210^{BCR-ABL} (b3a2 e b2a2) e P190^{BCR-ABL} (e1a2).

Características gerais dos pacientes

No grupo dos 45 pacientes, 32 eram do sexo masculino (idade média 38,6 anos) e 13 do sexo feminino (idade média 27,9 anos), com uma idade média geral de 34,9 anos. A faixa etária predominante desse grupo de pacientes está compreendida entre 31 e 55 anos com predomínio de indivíduos do sexo masculino.

No pré-TMO, a maioria dos pacientes se apresentou em fase crônica, com predomínio na faixa etária compreendida entre 31 a 55 anos (68,9%), seguido pela faixa entre 16 a 30 anos (17,8%). Poucos pacientes estavam incluídos entre 0 e 15 anos (2,22%) ou acima dos 55 anos (8,9%).

Apenas um único indivíduo (2,2%) encontrava-se em fase acelerada no momento do pré-TMO, e nenhum estava em crise blástica.

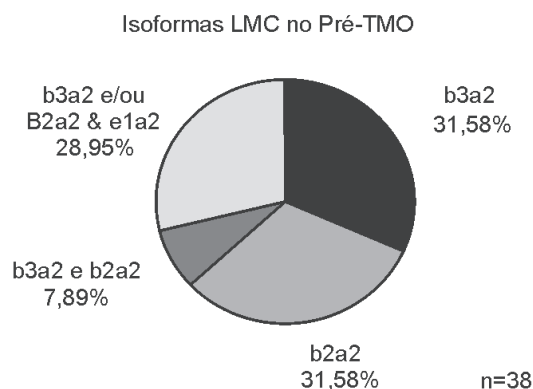


Figura 1. Distribuição das isoformas características da LMC presentes no pré-TMO

Expressão das isoformas no acompanhamento dos pacientes no pré e pós-TMO.

A Figura 1 descreve a distribuição das isoformas características da LMC no pré-TMO (b3a2 e b2a2). Ambas apareceram isoladas (31,58% cada uma) ou em conjunto (7,89%). A isoforma e1a2 apareceu em 11 pacientes deste grupo em conjunto com a(s) isoforma(s) da LMC, perfazendo um total de 28,95%.

Após o TMO seguiu-se o acompanhamento desse grupo de estudo. A análise dos resultados no pós-TMO foi realizada no período de três a quatro meses, pois acima desse período o protocolo de acompanhamento trimestral não foi seqüencial e ocorreu também entre um a cinco anos. Considerando os mesmos 38 pacientes do pré-TMO, a figura 2 mostra como estão distribuídas as isoformas no período de três a quatro meses pós-TMO. As isoformas b3a2 e a b2a2 apresentaram incidência de 26,31%, cada uma, enquanto juntas apresentaram 2,64%. Ambas as isoformas, em conjunto ou separadas, apresentaram uma queda sensível quando comparadas ao momento pré-TMO. Esse período mostra o aparecimento da negatividade em 34,21% dos pacientes.

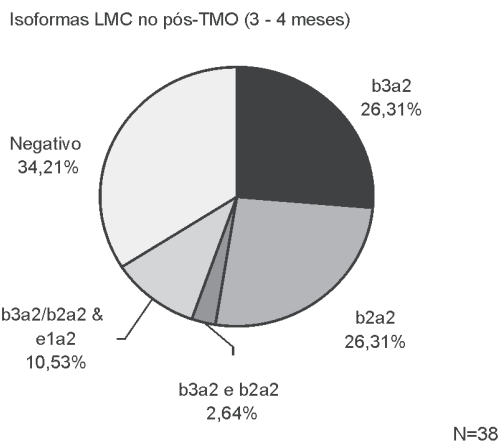


Figura 2. Distribuição das Isoformas características da LMC presentes durante o período do pós-TMO (primeiro ano).

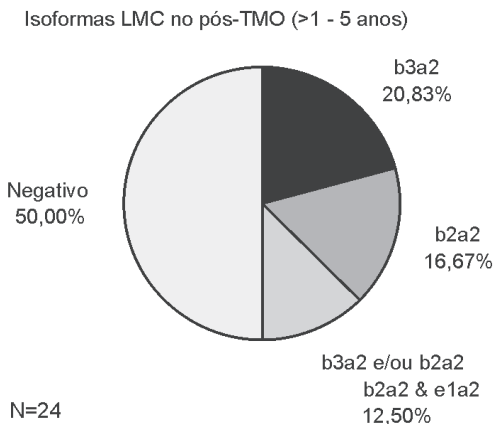


Figura 3. Distribuição das isoformas características da LMC presentes durante o período acima de um ano até cinco anos pós-TMO

O acompanhamento a longo prazo (> 1 ano a 5 anos) apresentou um maior número de amostras com critério para a exclusão (21), perfazendo um total de 24 amostras analisadas, pois, após um ano do TMO, os pacientes considerados em remissão tornam-se menos frequentes no retorno aos exames de rotina.

A figura 3 mostra que as isoformas b3a2 (20,83%) e a b2a2 (16,67%) apresentaram um decréscimo, seguido pela e1a2 em conjunto com ambas as isoformas (b3a2 e/ou b2a2) com 12,50%. Os pacientes com resultados negativos (50%) mantiveram um percentual significativo aumentado nesse período de avaliação, ou seja, resposta molecular completa na sensibilidade de 10-6.

O PCR multiplex também detecta o produto de amplificação e1a2 em conjunto com as isoformas b3a2 e/ou b2a2. Os iniciadores utilizados, apesar de específicos para a LMC, conseguem amplificar o produto e1a2, sendo esta técnica menos sensível que o PCR Nested.

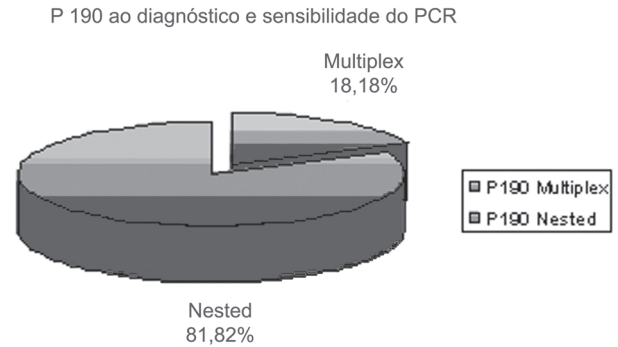


Figura 4. Presença da isoforma e1a2 em 11 casos ao diagnóstico de acordo com a sensibilidade do PCR

Dos 45 pacientes diagnosticados com LMC, 11 apresentaram a isoforma e1a2 em conjunto com as isoformas b3a2 e/ou b2a2.

Na figura 4 estão contidos os dados referentes à presença da isoforma e1a2 no pré-TMO em 11 pacientes, de acordo com a sensibilidade do PCR. O PCR multiplex apresentou um percentual de positividade menor (18,18%) em comparação ao PCR Nested, que apresentou 81,82% de positividade.

Avaliação da correlação entre as fases evolutivas da LMC com as isoformas no acompanhamento aos pacientes no pré e pós-TMO.

A figura 5 mostra que nos primeiros seis meses não existe uma correlação entre a positividade do PCR para as isoformas codificantes da P210BCR-ABL com a recaída dos pacientes. Entre seis meses e um ano é onde a correlação se faz mais evidente em contraste com o acompanhamento pós-TMO a partir de um ano. Nos pacientes pós-transplantados, a detecção de carga tumoral entre 6-12 meses se encontra associada à recaída na evolução do paciente.

A figura 6 mostra a correlação entre a presença de e1a2 ao diagnóstico e a evolução dos pacientes de acordo com a última avaliação individual.

A isoforma e1a2 esteve presente em 11 pacientes do pré-TMO e, conforme apresentado na Figura, 72,73% (n = 33) dos pacientes e1a2 positivos com LMC mantiveram-se em remissão, enquanto 27,27% (n = 12) foram a óbito e nenhum foi associado à recaída. A análise do estágio de evolução da LMC nesses pacientes foi realizada de acordo com a última observação ao término do acompanhamento deste trabalho.

Desfecho clínico dos pacientes

O desfecho clínico indica que os pacientes se encontravam do momento em que foi feita a última análise para a conclusão deste trabalho e está descrito na Figura 7.

A avaliação dos 45 pacientes nesta figura mostra que 62,22% estão incluídos no grupo de remissões, seguido por

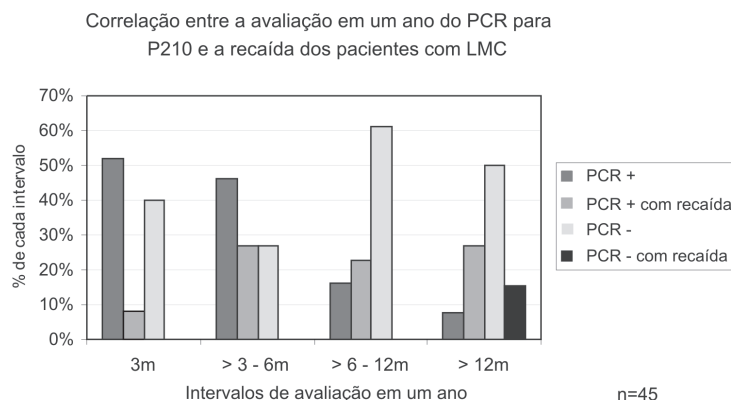


Figura 5. Relação do PCR qualitativo para detecção da P210^{BCR-ABL} com o estado clínico dos pacientes em intervalos de avaliação de três meses no período de um ano

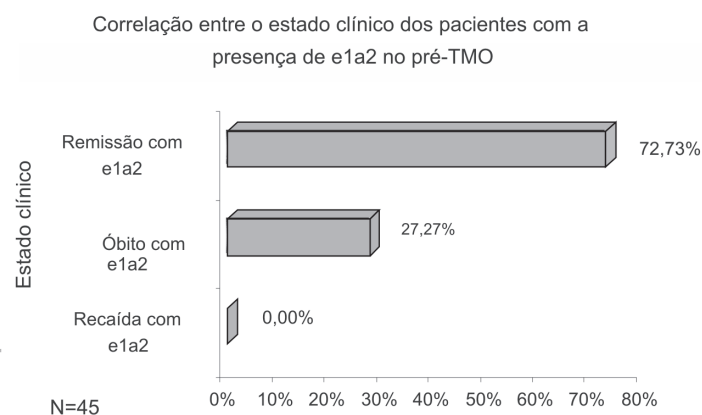


Figura 6. Correlação entre o estado clínico dos pacientes com a presença de e1a2 no pré-TMO

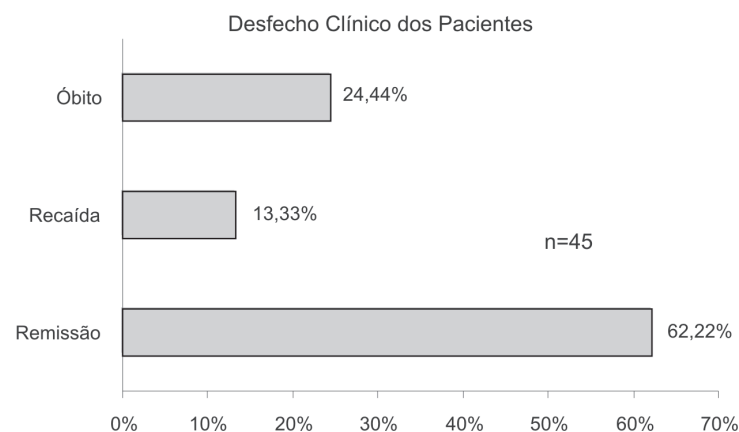


Figura 7. Desfecho clínico dos pacientes

24,44% de pacientes que foram a óbito e 13,33% que apresentaram recaída completa. A maioria dos pacientes alcançou a remissão no acompanhamento deste trabalho.

Discussão

No presente trabalho foram avaliadas 353 amostras pré e pós-TMO de 45 pacientes com LMC atendidos no Cemo e HUCFF/RJ.

Nas análises do estudo no pré-TMO, observou-se uma prevalência das isoformas características da LMC (b3a2 e/ou b2a2). A isoforma e1a2, característica da LLA, foi detectada em 11 pacientes em conjunto com essas isoformas.

Entre 3 e 4 meses pós-TMO observou-se uma diminuição no aparecimento das isoformas b3a2 e b2a2. Ambas as isoformas continuaram a aparecer em conjunto (2,64%) ou isoladas com a isoforma e1a2 (10,53%). Mesmo tendo sido observada uma diminuição percentual nesse caso, nesse período houve um percentual significativo de pacientes negativos (34,21%). A negatividade é um fato importante que pode justificar a oscilação destes percentuais. Contudo, estudos prospectivos fracassaram na confirmação de qualquer correlação significativa entre a localização do ponto de quebra no M-bcr e a resposta da doença. Isto significa que a presença de ambas as isoformas não desencadeiam diferença no desenvolvimento da doença.^{2,5}

De acordo com Dhingra *et al*⁶ e Li *et al*,⁷ o aparecimento do transcrito e1a2 (P190^{BCR-ABL}) em pacientes com LMC expressando P210^{BCR-ABL} anuncia a emergência da transformação aguda ou crise blástica. Analisando os resultados da detecção dos 11 casos de pacientes com e1a2 (P190^{BCR-ABL}) ao diagnóstico através da técnica de RT-PCR multiplex (18,18%) e em vários períodos pós-TMO, observamos que, na maioria dos pacientes com LMC, sua detecção se deu através do RT-PCR nested (81,82%). Este resultado pôde sugerir baixos níveis de carga tumoral.

Dados semelhantes aos nossos foram encontrados por Lichty *et al*,⁸ que detectaram a e1a2 (P190^{BCR-ABL}) em baixos níveis, justificando que estes resultados não necessariamente significam que o transcrito esteja mesmo em baixos níveis, mas que pode ser pouco detectado devido à competição dos primers entre os transcritos presentes no caso dos pacientes que coexpressavam P210^{BCR-ABL} e a P190^{BCR-ABL}.

Analisando os nossos resultados, observa-se uma positividade para a P210^{BCR-ABL} nos primeiros seis meses pós-TMO, com um conseqüente aumen-

to gradual da recaída dentro do primeiro ano de acompanhamento, especificamente entre 6 e 12 meses pós-TMO. A positividade do PCR para P210^{BCR-ABL} nesse último período está relacionada ao tipo de evolução de cada paciente. Dados semelhantes aos nossos foram encontrados por Radich,⁹ quando associados à detecção dos transcritos BCR-ABL em 6 a 12 meses pós-TMO com 42% de risco de recaída, oposto aos 3% de risco de recaída nos pacientes com RT-PCR negativo.

Embora todos os pacientes sejam PCR positivos antes de recair, aqueles com PCR positivo persistente ou intermitente no primeiro ano após o TMO têm uma probabilidade aumentada de recair,^{10,13} e um estado contínuo RT-PCR negativo correlaciona-se com uma baixa probabilidade de recorrência da doença.¹¹ Os nossos dados não apresentaram linearidade no acompanhamento, sendo, portanto, improdutiva a avaliação da presença do rearranjo BCR-ABL com o estado evolutivo dos pacientes.

Neste contexto, é fundamental a aplicação de técnicas moleculares capazes de detectar precocemente o alto risco de recaída nos pacientes com LMC após o TMO.

Nossos dados sugerem que a realização dos RT-PCRs qualitativos foi essencial para o diagnóstico e acompanhamento pós-TMO dos pacientes, pois em algumas amostras não houve a detecção do comossomo Ph1 pela citogenética, sendo detectado pela técnica molecular RT-PCR qualitativo, fato importante para a avaliação clínica do paciente.

A presença da e1a2 não determinou o prognóstico dos pacientes com LMC, mas sua presença indica a necessidade de um estudo com um maior número de pacientes.

Os nossos resultados mostram que 62,22% (28/45) dos pacientes alcançaram a remissão completa. De acordo com Lion T,¹² embora a cura possa ser alcançada em uma alta proporção de pacientes que são transplantados em fase crônica, (como no caso dos pacientes do nosso estudo) a recaída da doença permanece o principal problema clínico.

Os resultados obtidos mostram que a tecnologia molecular avança sempre com o intuito de detectar precocemente possíveis sinais que possam ser identificados para tentar fornecer qualidade de vida ao paciente com LMC.

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative clonal disorder caused by a mutation in a stem cell, resulting in the proliferation and accumulation of myeloid cells and their progenitors. The Philadelphia chromosome (Ph1) is a result of a mutual translocation of genetic material between the abl gene (Abelson murine leukemia) in chromosome 9 and bcr gene (breakpoint cluster region) in chromosome 22, resulting in the formation of the chimerical gene, BCR-ABL. In this work 45 patients were sequentially followed up in individual periodic evaluations, and 360 samples were selected and analyzed by PCR using the qualitative technique for isoforms characteristic of P210^{BCR-ABL} (b3a2 and b2a2) and P190^{BCR-ABL} (e1a2). In our pre-bone marrow

transplant study, a prevalence of isoforms characteristic of CML was observed (b3a2 and/or b2a2), a fact essential for the patients to be followed up within the CML protocol. The e1a2 isoform, characteristic of LLA, was detected in 11 patients together with the isoforms characteristic of CML. The detection of the e1a2 transcript was evaluated in respect to its probable role in LMC and was one of the parameters evaluated in this study. Rev. bras. hematol. hemoter. 2008;30(4):297-302.

Key words: Leukemia; leukemia research; chronic myeloid leukemia; polymerase chain reaction; kinase tyrosine.

Pesquisa realizada no Instituto Nacional de Câncer (Inca/RJ) e Universidade Federal Fluminense (UFF/RJ).

Tese desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Transplante de Medula Óssea (Cemo), do Instituto Nacional de Câncer (INCa), Rio de Janeiro, e na Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Ilana Zalberg Renault.

Referências Bibliográficas

1. Ezdinli EZ, Sokal JE, Crosswhite L, Sandberg AA. Philadelphia-chromosome-positive and -negative chronic myelocytic leukemia. *Ann Intern Med.* 1970;72(2):175-82.
2. Fioretto T, Nilsson PG, Aman P, Heim S, Kristofferson U, Malm C, et al. Clinical impact of breakpoint position within M-bcr in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 1993;7(8):1225-31.
3. Fu XY, Ge H, Manley JL. The role of the polyrimidine stretch at the SV40 early pre-mRNA 3' splice site in alternative splicing. *EMBO J.* 1988;7(3):809-17.
4. Saglio G, Pane F, Gottardi E, Frigeri F, Buonaiuto MR, Guerrasio A, et al. Consistent amounts of acute leukemia-associated P190BCR/ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis. *Blood.* 1996;87(3):1075-80.
5. Quackenbush RC, Reuther GW, Miller JP, Courtney KD, Pear WS, Pendergast AM. Analysis of the biologic properties of p230 Bcr-Abl reveals unique and overlapping properties with the oncogenic p185 and p210 Bcr-Abl tyrosine kinases. *Blood.* 2000;95(9):2913-21.
6. Dhingra K, Talpaz M, Kantarjian H, Ku S, Rothberg J, Gutterman JU, et al. Appearance of acute leukemia-associated P190BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia may correlate with disease progression. *Leukemia.* 1991;5(3):191-5.
7. Li S, Ilaria RL Jr, Million RP, Daley GQ, Van Etten RA. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med.* 1999;189(9):1399-412.
8. Lichty BD, Keating A, Callum J, Yee K, Croxford R, Corpus G et al. Expression of p210 and p190 BCR-ABL due to alternative splicing in chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1998;103(3):711-5.
9. Radich JP. The use of PCR technology for detecting minimal residual disease in patients with leukemia. *Rev Immunogenet.* 1999;1(2):265-78.
10. Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlations with acute graft-versus-host disease and relapse. *Br J Haematol.* 1993;84(1):67-74.
11. Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P, Goldman JM. Detection of

- residual leukemia after bone marrow transplant for chronic myeloid leukemia: role of polymerase chain reaction in predicting relapse. *Blood*. 1991;77(4):874-8.
12. Lion T. Clinical implications of qualitative and quantitative polymerase chain reaction analysis in the monitoring of patients with chronic myelogenous leukemia. The European Investigators on Chronic Myeloid Leukemia Group. *Bone Marrow Transplant*. 1994;14(4):505-9.
 13. Cross NC, Feng L, Chase A, Bungey J, Hughes TP, Goldman JM. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood*. 1993;82(6):1929-36.

Este trabalho contou com o auxílio financeiro do Ministério da Saúde MS-INCa, da Fundação Pró-Vida para o Transplante de Medula Óssea, do Instituto Nacional de Câncer (INCa) e do Rotary Internacional Distrito Rio de Janeiro.

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 20/08/2007

Aceito: 30/01/2008