



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DANIELLY CÔRTEZ VICENTE

**Quantificação do quimerismo após transplante alogênico
de células-tronco hematopoiéticas usando amplificação
por PCR em tempo real de polimorfismos de
inserção/deleção dialélicos**

CAMPINAS

2016

DANIELLY CÔRTEZ VICENTE

Quantificação do quimerismo após transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas usando amplificação por PCR em tempo real de polimorfismos de inserção/deleção dialélicos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Clínica Médica na Área de Concentração em Clínica Médica

ORIENTADOR: CÁRMINO ANTÔNIO DE SOUZA
COORIENTADOR: JOSÉ ANDRES YUNES

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA DANIELLY CÔRTEZ VICENTE, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. CÁRMINO ANTÔNIO DE SOUZA.

CAMPINAS

2016

Este projeto de pesquisa recebeu suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) concedido através do processo nº: 2010/50105-5.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

V662q Vicente, Danielly Côrtes, 1976-
Quantificação do quimerismo após transplante de células-tronco hematopoiéticas usando amplificação por PCR em tempo real de polimorfismos de inserção/deleção dialélicos / Danielly Côrtes Vicente. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Cármino Antonio de Souza.

Coorientador: José Andres Yunes.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. 2. Quimerismo. 3. Leucemia. 4. Recidiva. I. Souza, Carmino Antonio de, 1951-. II. Yunes, José Andres. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Chimerism quantification after allogeneic stem cells transplantation using real time PCR amplification of insertion/deletion diallelic polymorphisms

Palavras-chave em inglês:

Hematopoietic Stem Cells Transplantation

Chimerism

Leukemia

Recurrence

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Cármino Antonio de Souza [Orientador]

José Marques Comenalli Júnior

Afonso Celso Vigoritto

Frederico Luíz Dulley

Carlos Sérgio Chiattonne

Data de defesa: 03-06-2016

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

DANIELLY CÔRTEZ VICENTE

ORIENTADOR: CÁRMINO ANTONIO DE SOUZA

COORIENTADOR: JOSÉ ANDRES YUNES

MEMBROS:

1. PROF. DR. CÁRMINO ANTONIO DE SOUZA

2. PROF. DR. JOSÉ MARQUES COMENALLI JÚNIOR

3. PROF. DR. AFONSO CELSO VIGORITTO

4. PROF. DR. FREDERICO LUÍZ DULLEY

5. PROF. DR. CARLOS SÉRGIO CHIATTONE

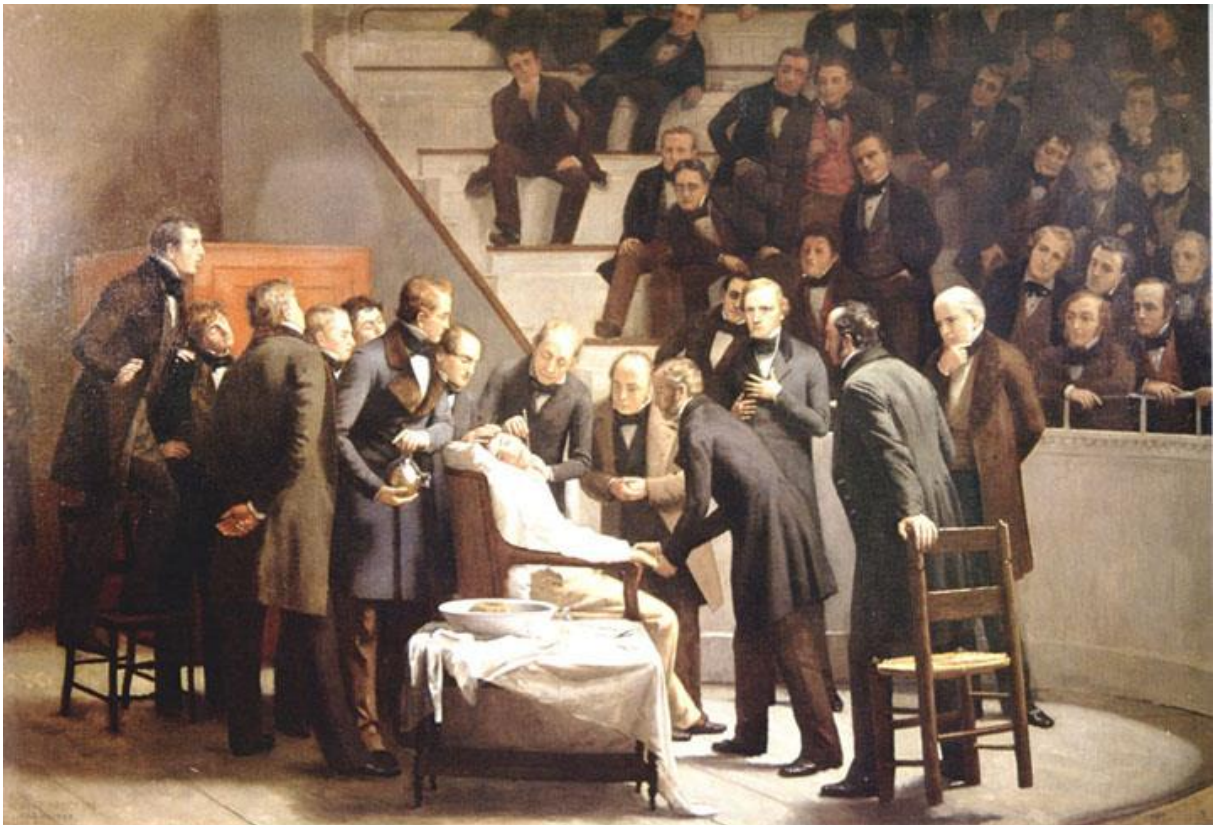
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 03/06/2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pacientes, que nos confiam suas vidas e depositam em nós toda a sua esperança, força e fé em busca da cura.



Quadro do pintor Roberto Hinckley, de 1882, reproduzindo a cena da operação realizada com anestesia geral pelo éter em 16/10/1846

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro aos meus pais **Jane Moreira Côrtes Vicente** e **João Paulo dos Santos Vicente**, pessoas fundamentais que sempre me deram as condições ideais para que eu atingisse meus sonhos: amor, cuidado e educação. Agradeço sempre a Deus por ter me mandado aqui como filha de vocês!

Agradeço ao meu marido **Sandro Silva Vilela**, que faz parte da minha história há 20 anos e que está sempre na primeira fila para me aplaudir, para me dar apoio e para me corrigir. Você é meu exemplo de conquista, pois tudo o que construiu foi com seu trabalho, sua dedicação e seus sonhos.

Agradeço aos meus filhos **Pedro Vicente Vilela** e **Luísa Vicente Vilela**, que me tornaram uma pessoa melhor e me mostraram o que é o amor mais profundo que alguém pode sentir.

Agradeço ao meu irmão **Rodrigo Côrtes Vicente** que é para mim um exemplo de médico e de pessoa, com uma sensibilidade imensa e um coração enorme.

Agradeço às minhas avós **Jacira Côrtes Moreira** e **Maria dos Santos (Mariquita)**, que ajudaram a me criar e me deram sempre um amor muito especial. Queria muito que a Jacira estivesse aqui, mas tenho certeza que, de onde estiver, ela está torcendo por mim.

Agradeço à minha prima-irmã **Luciana Leão Vicente**, que é um exemplo de força, coragem e dedicação. Quando penso que as coisas estão difíceis eu me lembro de você e de como você sempre lutou todos os dias para conquistar o que queria.

Agradeço aos meus sogros **Mary Silva Vilela** e **Aguinaldo Miranda Vilela**, que me acolheram em sua família e me deram sempre muito carinho.

Agradeço aos meus cunhados **Thais Ferraz**, **Simone Silva Vilela**, **Sergio Silva Vilela** e **Camila Mandel Barros**, que se tornaram minha família e só acrescentam coisas boas à minha vida.

Agradeço ao meu orientador **Cármino Antônio de Souza**, que antes de me orientar foi meu professor e é para mim um exemplo de médico, de pessoa e de líder.

Agradeço ao meu coorientador **José Andrés Yunes**, que me ajudou a colocar neste trabalho a angústia que eu sentia ao ver os pacientes recidivarem, e assim nasceu este projeto.

Agradeço ao meu amigo **Angelo Albertoni**, que me ajudou a fazer os testes de laboratório e, mais do que isso, me mostrou o que é ser apaixonado pelo trabalho que faz. Parabéns, o Brasil precisa de pesquisadores como você!

Agradeço a **Eliana Miranda** pela paciência e por não desistir de mim! Obrigada pelos muitos cálculos e pela excelência em seu trabalho.

Agradeço à minha funcionária **Cleuza Ribeiro**, que cuida de mim e da minha família com tanto amor e dedicação. Sem você seria tudo muito mais difícil.

Agradeço aos meus amigos e amigas **Fabrizio Malta de Napoli, Francis Daniele Apolinário, Elaine Maria dos Santos, Gabriella Faccioli Maia, Lilian Bianchi Pavarin, Carla Machado, Fernanda Floret, Ana Flávia Stein e Rachel Riechelmann**, que fazem parte da minha história e me ensinaram, cada um do seu jeito, a me divertir, a chorar, a amar e a crescer!

Agradeço a **Nicete Romano**, por todo o apoio. Sempre sabendo os telefones certos e as pessoas certas para ajudar no andamento dos processos.

Agradeço à **Universidade Estadual de Campinas**, Instituição que me proporcionou a formação médica e como pessoa. Só tenho boas lembranças do tempo passado lá e tenho orgulho de ter sido formada pela UNICAMP.

Agradeço ao **Hemocentro**, que me acolheu novamente neste projeto de pesquisa e em meu projeto profissional na hematologia.

Agradeço à **equipe do TMO: Afonso Celso Vigorito, Francisco José Penteado Aranha, Gislaine Borba de Oliveira e Marcos Paulo Colella**, pelo fornecimento dos dados clínicos dos pacientes.

Agradeço ao laboratório de biologia molecular, em especial a Clarisa Fernandes Ramos, pelo fornecimento das amostras de DNA.

Agradeço ao CIPOI por disponibilizar a estrutura do laboratório e a máquina de RQ-PCR.

**“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas
ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma
humana”**

Carl Jung

RESUMO

Apesar dos melhores resultados obtidos com o transplante de células-tronco hematopoiéticas ao longo dos anos, as altas taxas de recidiva da doença, que em pacientes com leucemias agudas pode variar de 30 a 70% dos casos, permanece um dos maiores desafios. O tratamento das recidivas tem melhores resultados se realizado precocemente. Estudos mostram que a detecção de quimera mista pós-transplante é capaz de prever a recaída na maioria dos casos e pode permitir o tratamento precoce e adequado, com probabilidade de sucesso maior do que se feito após a recaída hematológica da doença. A técnica atualmente utilizada para avaliação do quimerismo em pacientes transplantados na Unidade de Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) do Hospital das Clínicas da UNICAMP é o VNTR (*variable number tandem repeats*), cuja sensibilidade permite detectar quimera mista com tempo curto antes da recaída, o que não possibilita tempo hábil para o tratamento. Com o objetivo de antecipar a detecção da quimera mista, avaliamos neste estudo um método de quimerismo que utiliza a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RQ-PCR) de polimorfismos de inserção/deleção (indels) dialélicos, que tem maior sensibilidade do que o VNTR. Foram analisadas amostras de 41 pacientes adultos transplantados na Unidade de TCTH da UNICAMP entre 2005 e 2010 com os diagnósticos de leucemia aguda, leucemia crônica e síndrome mielodisplásica. Todos os transplantes foram de doadores aparentados e totalmente compatíveis e 80% foram realizados com condicionamentos mieloablativos. Quase metade (46,9%) dos pacientes recidivou, a maioria (73,3%) nos primeiros 6 meses. A sobrevida global mediana no grupo que recaiu foi de 9 (2-28) meses e, ao final do período de observação, somente um paciente (6,6%) estava vivo. Entre os 17 pacientes não recidivados, 5 (29,4%) faleceram, 4 (23,5%) em 9 meses pós-transplante, principalmente por complicações infecciosas. O método de RQ-PCR foi capaz de quantificar o quimerismo pós-transplante em quase todas as amostras com alta sensibilidade e nível mínimo de detecção de 0,01%. A técnica ainda demonstrou que a cinética do quimerismo é bastante diferente entre os grupos de pacientes recidivados e não recidivados. O grupo de não recidivados mostrou, inicialmente, uma queda menos intensa e mais progressiva na porcentagem de células do receptor, seguida por queda contínua e

progressiva, com a mediana de 6 meses para atingir níveis de quimerismo abaixo de 0,1%. Por outro lado, os pacientes no grupo de recidivados demonstraram uma queda intensa inicial e então um aumento rápido e precoce no quimerismo antes da recidiva hematológica. A técnica de quimerismo por PCR quantitativo em tempo real de polimorfismos indels foi reprodutível no grupo de pacientes transplantados em nossa instituição e demonstrou que a cinética do quimerismo é bastante diferente entre os grupos de pacientes recidivados e não recidivados. Devido à alta sensibilidade do método, a avaliação do quimerismo em níveis tão baixos poderia nos ajudar a compreender este complexo mecanismo onde células geneticamente distintas interagem em diversas situações pós-transplante e auxiliar a otimização dos regimes de condicionamento para obter melhores respostas com menores efeitos colaterais.

Palavras-chave: Transplante de células-tronco hematopoiéticas. Quimerismo. Leucemia. Recidiva.

ABSTRACT

Despite better results with hematopoietic stem cell transplantation over the years, high rates of relapse, which in acute leukemia patients can reach 30 to 70% of cases, remains a major challenge. The treatment of relapse has better outcomes if performed early. Studies show that the detection of mixed chimera after transplantation can predict for relapse in most cases and it may allow for earlier appropriate treatment, with higher chances of success than if done after hematologic relapse. The technique currently used for patients transplanted at the Stem Cell Transplantation (SCT) Unit of the University of Campinas is VNTR (*variable number tandem repeats*), which sensitivity permits the detection of mixed chimera shortly before relapse and doesn't allow enough time for treatment. In order to anticipate the detection of mixed chimera, in this study we tested a method of quantitative PCR of insertions–deletions (indels) diallelic polymorphisms, which has higher sensitivity compared to VNTR. We analyzed samples from 41 adult patients submitted to HSCT at the SCT Unit of the University of Campinas between 2005 and 2010. Patients were diagnosed with acute leukemia, chronic leukemia or myelodysplastic syndrome. All transplants were performed with fully matched related donors and 80% used myeloablative conditionings. Almost half (46.9%) of the patients relapsed, most of them (73.3%) in the first 6 months. The median overall survival for relapsed patients was 9 (2–98) months and, at the end of the observation period, only one patient (6.6%) was alive. Among 17 non-relapsed patients, five (29.4%) died, 4 four (23,5%) in 9 months post HSCT, mostly from infectious complications. The RQ-PCR method was able to quantify the chimerism in almost all samples and it was highly sensitive, with a minimum level of detection reaching 0.01%. This technique showed that the chimerism kinetics was very different between groups of relapsed and non-relapsed patients. The non-relapsed group showed, initially, a less deep and more progressive fall in the percentage of recipient cells, followed by a continuous and slow fall along the time, with a median period of about 6 months before chimerism clearance reached levels below 0.1%. Patients in the relapsed group, on the other hand, showed a steep initial drop and then a very early and fast rise in chimerism previous to hematologic relapse. The method of RQ-PCR of indels polimorphisms could be reproduced in this group of patients transplanted in our Institution and showed that the chimerism kinetics is very different between relapsed and non relapsed patients.

Due to the high sensitivity of the method, the evaluation of chimerism in such low levels could help us understand the complex mechanism of genetically distinct cells interacting in different post-transplantation settings and lead to a better optimization of the current conditioning regimens for better outcomes with lower adverse effects.

Key Words: Hematopoietic Stem Cells Transplantation. Chimerism. Leukemia. Relapse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	pág
Figura 1. Apresentação de antígenos de histocompatibilidade menores (mHA) ao linfócito T do doador	17
Figura 2. Modelo de resposta EVL	18
Figura 3. Fases do transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico mieloablativo	20
Figura 4. Fases do transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico não mieloablativo	21
Figura 5. Método de amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
Figura 6. Avaliação do quimerismo pelo método de PCR de <i>short tandem repeats</i> (STR)	26
Figura 7. Método de amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RQ-PCR)	28
Figura 8. Exemplo de curva de amplificação por RQ-PCR	35
Figura 9. Curvas de Kaplan-Meier da Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Doença	48
Figura 10. Porcentagem de quimera pelo RQ-PCR e correlação com quimera completa ou mista pelo VNTR nos meses 1, 3 e 6 pós-transplante	50
Figura 11. Cinética do quimerismo hematopoiético pós-transplante em pacientes recidivados e não recidivados	51

LISTA DE TABELAS

	pág
Tabela 1. Efeito EVL em diferentes neoplasias hematológicas	19
Tabela 2. Comparação de diferentes métodos para análise do quimerismo	22
Tabela 3. Amplificação e aquisição de dados	34
Tabela 4. Eficiência de amplificação de cada gene	38
Tabela 5. Resultados dos testes nas amostras de um paciente	39
Tabela 6. Dados clínicos dos pacientes	43
Tabela 7. Frequência de polimorfismos informativos	44
Tabela 8. Situação da doença de base antes do transplante e correlação com resultados do transplante (grupo de pacientes recidivados versus não recidivados)	45
Tabela 9. Número de amostras para análise até 6 meses pós-TCTH e situação dos 32 pacientes analisados	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CsA	Ciclosporina A
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CDs	Células dendríticas
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBMT	<i>European Group for Blood and Marrow Transplantation</i>
EVL	Enxerto <i>versus</i> leucemia
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> (Hibridização in situ por fluorescência)
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ILD	Infusão de linfócitos do doador
INDELS	Polimorfismos de inserção/deleção
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
mHA	Antígeno de Histocompatibilidade menor
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade Maior)
MMF	Micofenolato mofetil
MTX	Metotrexate
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Progressão de doença
RC	Remissão completa
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphisms</i> (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição)
RQ-PCR	PCR em tempo real quantitativo
SLD	Sobrevida livre de doença
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNP	<i>Single Nucleotide Polimorphism</i>
STR	<i>Short tandem repeat</i>
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Objetivos	31
3. Metodologia	32
3.1. Seleção de pacientes	32
3.2. Análise de quimerismo	32
3.2.1. Quantificação do DNA para análise	32
3.2.2. Avaliação do quimerismo pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (RQ-PCR).....	33
3.2.3. Avaliação das amostras pré-transplante.....	36
3.2.4. Avaliação das amostras pós-transplante.....	36
4. Análise estatística.....	41
5. Resultados	42
6. Discussão	53
7. Conclusão	58
8. Referências	59
9. Anexos.....	68
9.1. Ficha de dados clínicos.....	69
9.2. Tabela com os dados dos pacientes	70
9.3. Carta de aprovação do estudo no CEP	72
9.4. Versão do artigo publicado na revista BMT	74
9.5. <i>License to publish</i> – autorização para o autor utilizar o artigo em teses	76

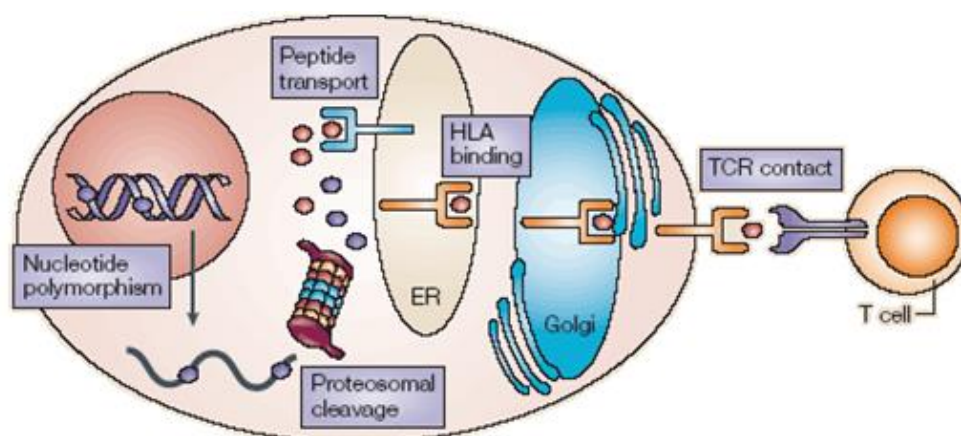
1. INTRODUÇÃO

Desde os primeiros casos relatados, há aproximadamente 60 anos, o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) tem obtido melhores resultados, e vem sendo adotado, cada vez mais, como opção terapêutica no tratamento de diversas doenças malignas e não malignas. Ao longo dos anos, o progresso no TCTH ocorreu, principalmente, graças à melhora na terapia de suporte e no manejo das complicações infecciosas. Segundo uma análise realizada pelo “European Group for Blood and Marrow Transplantation” (EBMT) em 14403 pacientes transplantados por leucemia entre 1980 e 2001, houve redução significativa das mortes por infecção. Não foi observada redução nas mortes devido à doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) ou outras causas, e as mortes secundárias à recaída da doença aumentaram¹. Outros trabalhos confirmam que os melhores resultados do TCTH estão ligados, principalmente, à redução das mortes relacionadas ao transplante^{2,3}, com pouca mudança na incidência de recaídas, que permanece a principal causa de falha do tratamento⁴. Com isso, a principal causa de insucesso no TCTH para leucemias agudas é a recidiva da doença, que ocorre em aproximadamente 30 a 70% dos casos, dependendo de fatores como: fase da doença, tipo de enxerto e de condicionamento utilizados, presença de DECH, entre outros⁵⁻⁷. As opções de tratamento da leucemia que recidiva após o transplante são limitadas e têm resultados muito insatisfatórios. Pode-se suspender abruptamente a imunossupressão, se o paciente ainda fizer uso, usar quimioterapia convencional para citorredução, radioterapia para recidivas localizadas, tratamento com citocinas (interferons e interleucina-2), ou realizar um segundo transplante, com índices de cura em torno de 25%^{8,9}.

Outra estratégia terapêutica bastante utilizada no tratamento da recidiva pós-TCTH é a imunoterapia, através da infusão de linfócitos do doador (ILD), com o intuito de induzir o efeito enxerto versus leucemia (EVL). O termo “imunoterapia adotiva” foi criado por Mathe¹⁰ no início dos anos 60, quando pouco se sabia ainda sobre seleção de doadores, condicionamento adequado e prevenção de DECH. Nos anos 70, Weiden et al¹¹ descreveu o efeito benéfico da DECH na incidência da recidiva da leucemia e na sobrevida. O papel dos linfócitos T se tornou evidente quando a depleção de células T do enxerto foi introduzida na prática clínica para a prevenção da DECH^{12,13} e a infusão de linfócitos do doador mostrou-se eficaz na

reversão da quimera mista em quimera completa¹⁴. A fisiopatologia da DECH e do efeito EVL é complexa e envolve diversas interações celulares e de citocinas. De forma resumida, proteínas endógenas nas células do receptor que diferem daquelas do doador devido a polimorfismos genéticos promovem peptídeos que se ligam ao HLA. Estes peptídeos servem como antígenos de histocompatibilidade menores para as células T do doador (Figura 1)¹⁵. Os linfócitos T do doador são estimulados pelas células dendríticas (CDs) do receptor através da apresentação destes antígenos de histocompatibilidade menores (mHA). Linfócitos *Helper* CD4⁺ são estimulados por estes complexos peptídicos do HLA (Antígeno Leucocitário Humano) classe II das CDs, e por sinais adicionais de moléculas de adesão e citocinas. As CDs também estimulam células T citotóxicas CD8⁺ através da apresentação de peptídeos do HLA classe I. As CDs ativadas enviam uma “licença para matar” às células T citotóxicas. As células T capazes de reconhecer mHA expressos somente em células hematopoiéticas poderiam contribuir para o efeito EVL e a eliminação das células leucêmicas sem desencadear a DECH. De outra forma, células T que reconhecem antígenos expressos por células hematopoiéticas e pelo epitélio contribuiriam tanto para o efeito EVL quanto para a DECH¹⁵⁻¹⁷. Estas interações estão representadas nas **Figuras 1 e 2**.

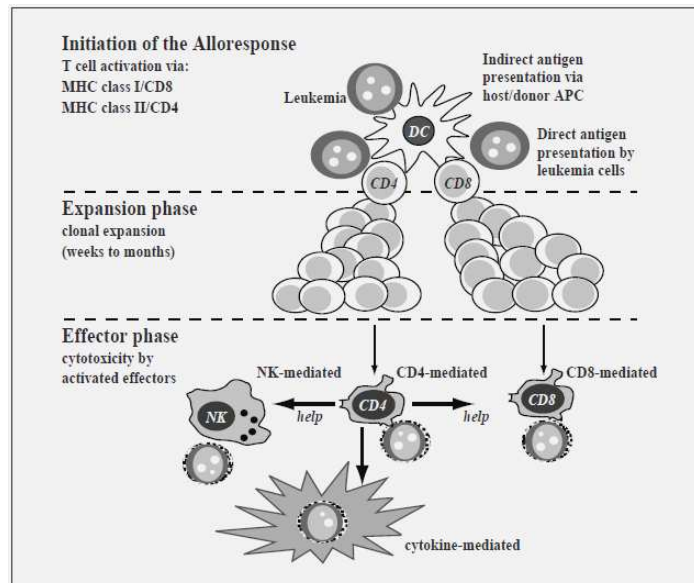
Figura 1. Apresentação de antígenos de histocompatibilidade menores (mHA) ao linfócito T do doador



Fonte: Nat. Review Cancer, 2004¹⁵

Os mHAs surgem dos mecanismos celulares normais de processamento e apresentação de antígenos estranhos às células T. Peptídeos que resultam da degradação proteolítica de proteínas endógenas são transportados pelo transportador de peptídeo e apresentados à superfície como um complexo com o HLA. Polimorfismos na sequência genética podem levar a diferenças em proteínas homólogas entre o receptor e o doador que podem ser reconhecidos como estranhas pelas células T do doador¹⁵.

Figura 2. Modelo de resposta EVL



Fonte: Stem Cells, 1997¹⁷

Linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ são estimulados pelas células leucêmicas residuais e/ou pelas células apresentadoras de antígeno do receptor ou doador. Ocorre a ativação das células T do doador estimuladas também por diversas citocinas. Acredita-se que o efeito EVL se dê de 3 formas: ataque celular direto às células leucêmicas através de perforinas dos linfócitos citotóxicos, morte por apoptose através de receptores celulares e morte celular ou controle da proliferação mediados por citocinas¹⁷.

Há, atualmente, vários trabalhos que demonstram a eficácia da ILD como tratamento da recidiva, principalmente nos pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC)¹⁸⁻²⁰, com índices de resposta em torno de 60-70% (**Tabela 1**)¹⁷. Nas leucemias agudas os resultados são desfavoráveis e, mesmo os pacientes que inicialmente respondem à ILD, apresentam nova recaída, muitas vezes em sítios extramedulares. A resposta é de, aproximadamente, 30% nos casos de leucemias mieloides agudas e ainda menores nas leucemias linfoides agudas²⁰⁻²³. Um importante fator que influencia a resposta à ILD é o tipo de recidiva. Pacientes com LMC em recidiva molecular ou citogenética têm o dobro de chance de resposta em comparação a pacientes com recidiva hematológica²⁴.

Tabela 1. Efeito EVL em diferentes neoplasias hematológicas

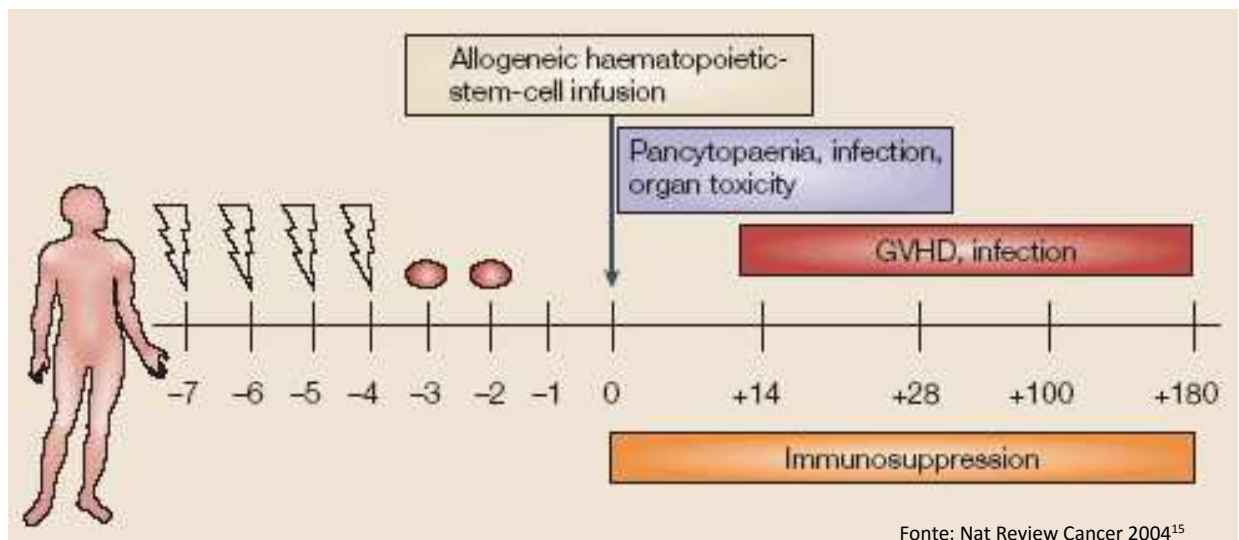
Doença	Probabilidade de recidiva TCTH não manipulado	Probabilidade de remissão após ILD
LMC Fase crônica com doença residual mínima Fase crônica com doença hematológica Fase acelerada Crise blástica	10-20% >60%	>80% 70% 25% <5%
LMA	10-20%	25%
SMD	25-45%	25%
LLA	10-45%	20%
Mieloma múltiplo	30-60%	Até 60%

Para tentar obter melhores resultados com a infusão de linfócitos, sua indicação começou a ser mais precoce, a partir da identificação de marcadores moleculares da doença capazes de prever a recaída. Com uma “massa tumoral” menor, o efeito EVL poderia ser potencializado. Desta forma, surgiram trabalhos que descreveram o uso da ILD baseada na detecção da doença residual mínima^{25,26} e do quimerismo misto^{23,25-28}.

Para compreender melhor como estes marcadores podem ser usados na detecção precoce da recidiva, é importante conhecer a dinâmica das alterações celulares que ocorrem no transplante de células-tronco hematopoiéticas (**Figuras 3 e 4**). O transplante alogênico convencional inicia-se com o condicionamento, fase em que é administrada a quimioterapia, associada ou não à radioterapia. Seu objetivo é reduzir, ou mesmo erradicar, as células neoplásicas e as células imunocompetentes do receptor. Após o condicionamento, a medula óssea tornar-se-á aplásica e pronta para receber o enxerto. Segue-se ao condicionamento a fase de infusão das células-tronco hematopoiéticas do doador. Estas células são coletadas diretamente da medula óssea ou do sangue periférico do doador e administradas ao receptor por acesso venoso central. Após a infusão do enxerto, segue-se a fase de enxertia, onde as células-tronco se direcionarão à medula óssea e darão início à

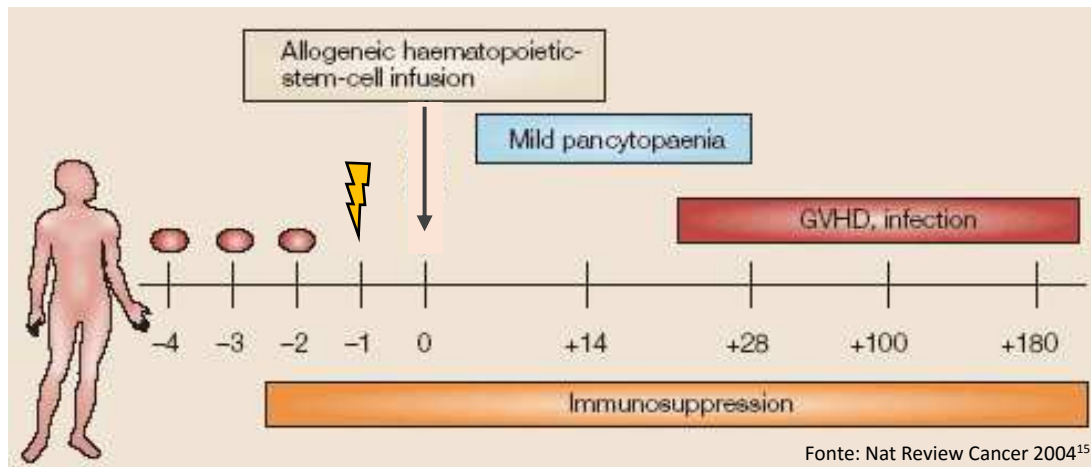
nova hematopoiese. Além da repopulação da medula óssea e produção de todos os elementos do sangue, as células do doador serão responsáveis pelo controle imunológico e poderão auxiliar no reconhecimento e destruição de células neoplásicas residuais (efeito enxerto versus leucemia, EVL). A função da medula óssea é medida clinicamente através do monitoramento das células do sangue periférico. A pega de neutrófilos (neutrófilos $> 0,5 \times 10^9/L$ em 3 dias consecutivos) habitualmente ocorre primeiro, em torno de 10-14 dias nos transplantes alogênicos aparentados convencionais. A pega de plaquetas (plaquetas $> 20 \times 10^9/L$ após pelo menos 7 dias sem transfusão) ocorre em torno de 21 dias pós-transplante. Nos transplantes de intensidade reduzida, ou não mieloablativos, o mesmo processo é realizado. Como não há mieloablação, o período de citopenias é mais curto ou pode não ocorrer. Como a atividade antitumoral direta é pequena, estes regimes de condicionamento dependem quase exclusivamente do efeito EVL que é mediado pelas células imunes do doador¹⁷.

Figura 3. Fases do transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico mieloablativo



Neste exemplo, o esquema de condicionamento começa 7 dias antes (D-7) da infusão das células-tronco hematopoiéticas (D0). São 4 dias de radioterapia (⚡) seguidos por dois dias de quimioterapia (⊕) e um dia de descanso (D-1). Após a infusão, seguem-se os períodos de citopenias, imunossupressão, risco de DECH e infecções. Medicamentos imunossupressores são administrados após o transplante para prevenção da DECH.

Figura 4. Fases do transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico não mieloablativo



Neste exemplo de transplante não mieloablativo, o condicionamento se inicia 4 dias antes (D-4) da infusão de células-tronco hematopoiéticas (D0) com quimioterapia (●) por 3 dias seguida por radioterapia (⚡) e infusão das células. Após a infusão, seguem-se os períodos de citopenias, que podem ser leves ou nem ocorrer, risco de DECH e infecções. A imunossupressão é mais precoce e suficiente para permitir a enxertia das células do doador. Medicamentos imunossupressores são utilizados para prevenir rejeição e DECH.

De maneira geral, são as células do doador que retomam a hematopoiese após o transplante. Isto pode ser medido através das técnicas de avaliação do quimerismo. O termo quimerismo tem sido usado para descrever a presença de células hematopoiéticas alogênicas em um receptor de transplante. Diz-se que há quimerismo completo quando todas as células detectadas são originadas do doador. Quando são detectadas células originadas do doador e do receptor o quimerismo é dito misto²⁹. Sabe-se que a manutenção da hematopoiese completa do doador pós-transplante é essencial para a prevenção da recaída. A presença de quimerismo misto, principalmente se ele se mostrar ascendente, ou seja, com aumento progressivo de células originadas do receptor, está associada à recaída da doença em aproximadamente 90% dos casos³⁰, e é capaz de antecipá-la em aproximadamente 2 meses^{28,31}. Consequentemente, a determinação do quimerismo hematopoiético no seguimento pós-transplante pode ser utilizado como “sistema de aviso precoce” para a recaída da doença. Vários métodos foram desenvolvidos para a determinação do quimerismo. A **Tabela 2** abaixo resume as principais técnicas para a análise do quimerismo, suas vantagens e desvantagens e o nível de sensibilidade relatado^{32,33}.

Tabela 2. Comparação de diferentes métodos para análise do quimerismo

Método	Sensibilidade %	Aplicabilidade	Vantagens	Desvantagens	Ref.
Fenotipagem eritrocitária	0,1-5	Alta	Simples, rápido, preciso	Latência longa, linhagem-específica, transfusões dificultam a avaliação	34,35
RFLPs	5-10	Alta	Alta informatividade	Consome muito tempo, trabalhoso	36
Citogenética	5	Baixa		Consome muito tempo	37
FISH X/Y	0,1	Baixa	Baixo falso positivo, grande número de células, alta sensibilidade	Restrito a transplantes com sexos diferentes	38,39
VNTR/STR	1-5	Muito alta	Informativo, pequenas quantidades de material, rápido	Sensibilidade moderada	30,40,41
RQ-PCR	0,01-0,1	Média-alta	Alta sensibilidade, rápido	Falsos positivos em teste baseados em SNP, alta especificidade em PCRs específicos para o cromossomo Y	42-45

Ref.= referência

RFLPs: *restriction fragment length polymorphisms* (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição), FISH: hibridização *in situ* por fluorescência, RQ-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo

A fenotipagem eritrocitária foi uma das primeiras técnicas amplamente utilizadas para confirmar a enxertia de células do doador⁴⁶. Baseia-se na diferença de antígenos eritrocitários entre doador e receptor e foram descritos métodos sorológicos^{35,46}, por microesferas fluorescentes³⁴ e por citometria de fluxo para identificar os antígenos ABO, Rh, MNS, Kell, Duffy, Kidd, Lutheran e P³⁵. Algumas desvantagens dificultam a utilização rotineira do método. Devido à longa vida das

hemácias na circulação, as hemácias do receptor ou as provenientes de transfusões podem ser detectadas por meses após o transplante³⁵ e prejudicar a avaliação do quimerismo. Além disso, o método avalia somente uma linhagem celular, e nos casos de hemólise por incompatibilidade ABO em que pode haver retardo no aparecimento de hemácias do doador mesmo em situação de pega adequada, não é possível avaliar o quimerismo.

A RFLP (*restriction fragment length polymorphism*)^{36,46,47}, traduzida como Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição, é uma técnica que utiliza enzimas de restrição que cortam o DNA em pontos específicos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos que são separados e visualizados em forma de bandas. O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de seqüências específicas de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismos. Diferenças na seqüência de DNA dos indivíduos podem também resultar de inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alterem a distância entre pares de sítios de restrição. Ao ser submetido a clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A separação é feita por eletroforese em gel de agarose e a visualização pode ser feita por *Southern Blot*. A hibridização com sondas radiomarcadas produz padrões diferentes que refletem o tamanho de seqüências específicas de DNA limitadas pelos pontos de corte das endonucleases testadas. Esta técnica também não é mais utilizada por vários motivos. O *Southern Blot* é complexo e muito trabalhoso para ser usado como rotina no laboratório. O uso de sondas radiomarcadas necessárias para ter sensibilidade adequada demanda tempo para a revelação e isto pode atrasar o resultado. Além disso, a sensibilidade é baixa, de aproximadamente 10%.

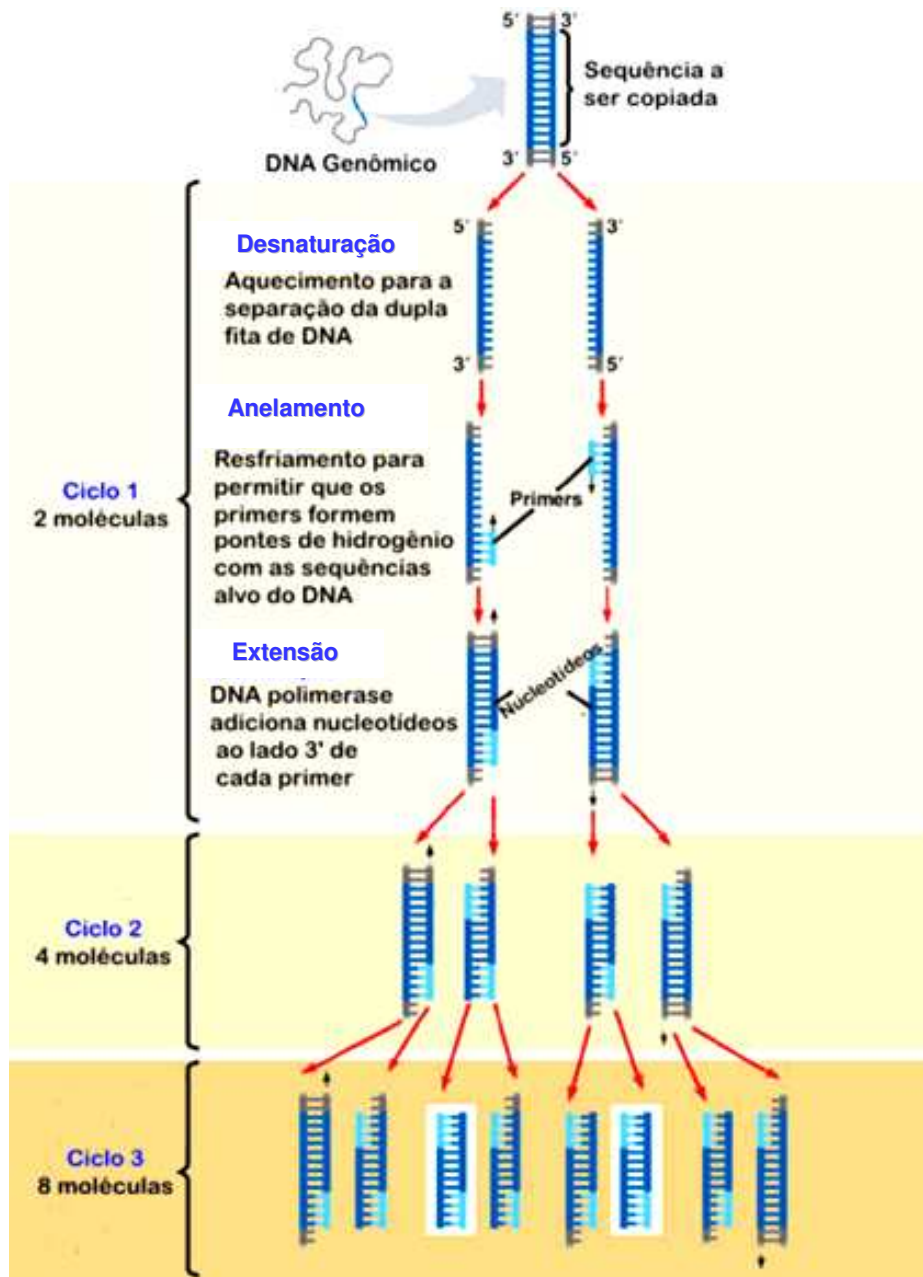
A citogenética convencional é um método bem estabelecido para a avaliação do quimerismo. Em casos de doador e receptor de sexos diferentes, os cromossomos sexuais podem ser utilizados. Outra situação é na presença de alterações cromossômicas relacionadas à doença de base como, por exemplo, na leucemia mieloide crônica cromossomo *Phyladelphia* positivo (Ph+), onde o

marcador citogenético está presente no receptor. As limitações do método são a ausência de marcadores informativos em casos de transplante do mesmo sexo, a técnica é trabalhosa e leva tempo para ser realizada, requer técnico bem treinado e o número de metáfases pode ser limitado. Devido a isso, a sensibilidade e a precisão do método são limitadas^{37,46}.

O estudo citogenético por hibridização *in situ* de cromossomos sexuais por fluorescência^{39,46} tem muitas vantagens em relação à citogenética convencional. A técnica é mais simples e demanda menos tempo, pode ser usada em células em metáfase ou intérfase, pode ser usada para avaliar marcadores genotípicos ou morfológicos, como marcadores de superfície celular e um número grande de células pode ser analisado, o que permite melhores sensibilidade e precisão. É importante realizar a citogenética convencional ou o FISH antes do transplante para investigar casos de perda do cromossomo Y associada ao envelhecimento ou ao cariótipo da célula tumoral e variações constitucionais do cromossomo Y. O uso da mistura de sondas para marcar os cromossomos X e Y ajuda a eliminar estes problemas bem como problemas técnicos⁴⁸.

As principais limitações destes métodos são o grande consumo de tempo e a não aplicabilidade a todos os pacientes. O grande avanço na determinação do quimerismo veio com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)^{30,31,40,46}. O método de PCR permite a amplificação exponencial de segmentos curtos do DNA, conforme representado na **Figura 5** abaixo.

Figura 5. Método de amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR)

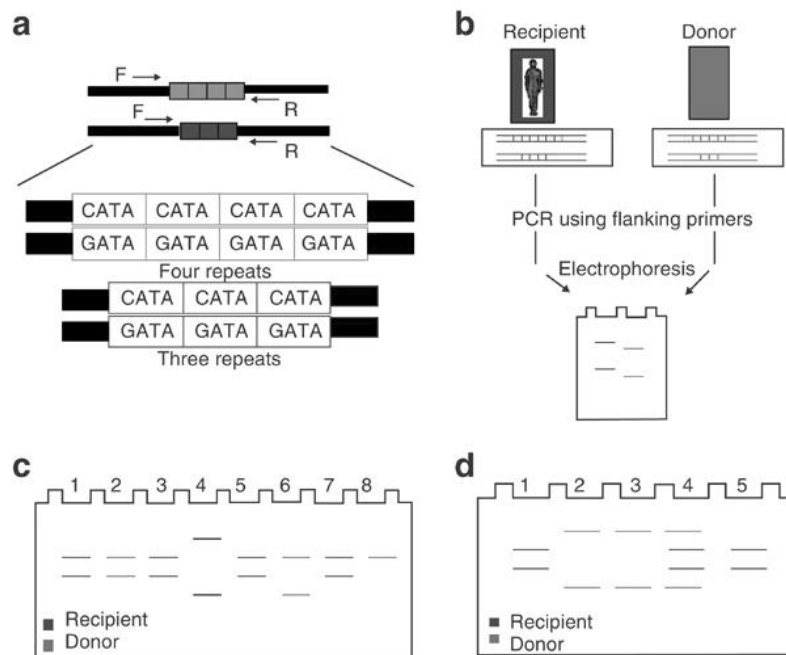


Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Biotecnologia/PCR.php>

A amostra de DNA, a enzima que faz a replicação (DNA polimerase), os nucleotídeos de DNA e os *primers* complementares à sequência de DNA são misturados e levados à máquina de PCR. A temperatura é elevada a 95°C para desnaturar o DNA. Cada fita simples do DNA que foi desnaturado serve de molde para a síntese de novas cadeias complementares. Para isso resfria-se a 58°C e os *primers* se anelam ao início das duas fitas simples, servindo de iniciadores para a enzima polimerase. A temperatura é novamente elevada a 72°C (temperatura ideal de funcionamento da DNA polimerase) para a duplicação da fita. A DNA polimerase inicia, após o final do *primer*, a colocar os nucleotídeos livres na fita de DNA ligando-os por complementaridade, formando assim nova fita dupla.

Os métodos de PCR convencional mais utilizados para a avaliação do quimerismo são a amplificação de minissatélites (“variable number of tandem repeats”: VNTR) e de microssatélites (“short tandem repeat”: STR). Algumas seqüências do DNA se repetem consecutivamente, e o número de repetições destas seqüências pode variar entre os indivíduos. Estas repetições podem ser compostas por grupos de microssatélites com 2-8 pares de base (por exemplo CACACA e complementar GTGTGT) ou de minissatélites com 8-50 pares de base. Existem polimorfismos no número de repetições consecutivas destas seqüências em um determinado locus. Este polimorfismo é determinado no receptor e no doador antes do transplante e pode ser utilizado como marcador na avaliação do quimerismo pós-transplante. A **Figura 6** demonstra uma análise de STR e como os achados podem ser interpretados⁴⁹.

Figura 6. Avaliação do quimerismo pelo método de PCR de *short tandem repeats* (STR).



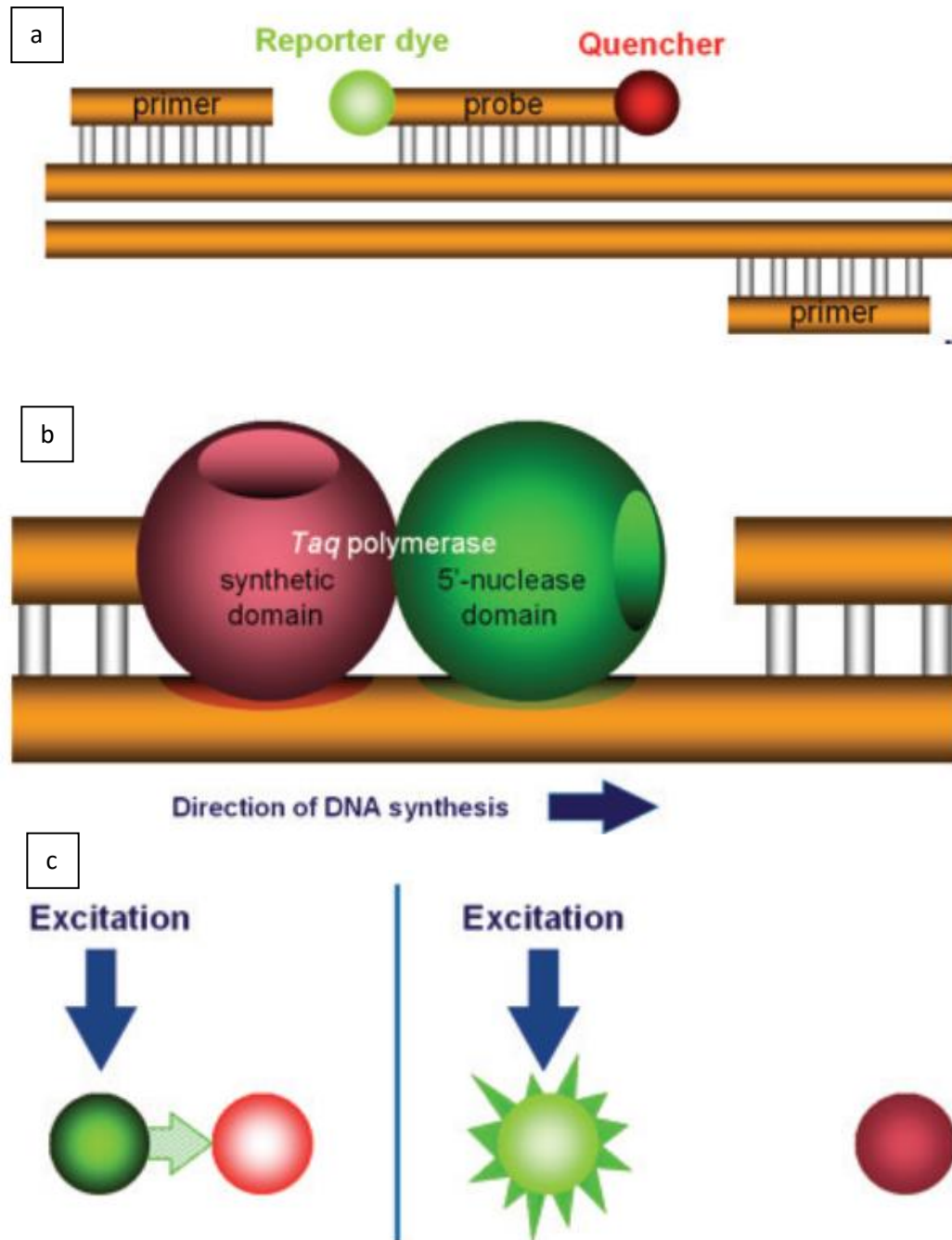
Fonte: Bone Marrow Transpl, 2004⁴⁹

- Repetições consecutivas que indicam diferentes alelos com base na diferença nos números de repetições em 2 cromossomos; F – *primer forward*, R – *primer reverse*.
- Análise do quimerismo pelo STR: o doador e o receptor têm diferentes números de repetições (alelos) no *locus* de STR amplificado por PCR.
- Informatividade de diferentes marcadores STR: nas colunas 1 e 2 não são informativos; nas colunas 3 e 4 os marcadores são informativos com ambos os alelos diferentes, nas colunas 5 e 6 são informativos com um alelo diferente e nas colunas 7 e 8 são informativos com um alelo diferente pois o doador é homocigoto.
- Resultados de quimerismo detectados pela análise de STR: coluna 1 – receptor antes do HSCT, coluna 2 – doador, coluna 3 – quimerismo completo, coluna 4 – quimerismo misto e coluna 5 – rejeição do enxerto e recidiva da doença.

Estas técnicas tornaram possível o estudo do quimerismo em todos os pacientes e em curto intervalo de tempo pós-transplante. No entanto, a sensibilidade das técnicas convencionais de PCR é de 1-5% e, conseqüentemente, uma parte considerável dos pacientes ainda recai pouco tempo após uma determinação de quimerismo completo^{30,40,41}, provavelmente porque a quantidade de células do paciente não atingiu o nível mínimo de detecção do método.

Novas técnicas para determinação do quimerismo por PCR quantitativo em tempo real (RQ-PCR) foram desenvolvidas^{50,51}. O método usa a atividade de 5' nuclease da Taq polimerase para clivar um probe hibridizante não extensível durante a fase de extensão do PCR. Os probes apresentam 2 corantes fluorescentes, denominados corante repórter (*reporter dye*) e corante silenciador (*quencher dye*). A degradação do probe pela polimerase durante a fase de extensão do DNA libera o corante repórter, que não é mais silenciado pelo corante silenciador e emite o pico de fluorescência. A fluorescência é medida pelo aparelho continuamente durante a amplificação do DNA, ou seja, as reações são monitoradas em tempo real (**Figura 7**).

Figura 7. Método de amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RQ-PCR)



A amplificação do DNA ocorre como no PCR convencional. Os primers se anexam às duas fitas simples do DNA, servindo de iniciadores para a enzima Taq polimerase. O probe tem uma sequência gênica específica e deve se ligar ao alvo entre os dois primers. De um lado do probe está o corante repórter (reporter dye), que é um corante fluorescente que irá reportar a amplificação do gene alvo. Do outro lado do probe está o corante silenciador (quencher dye), que bloqueia a fluorescência do repórter em probes intactos. O silenciador também bloqueia o final 3' do probe de forma que ele não pode ser estendido pela DNA polimerase (a). A atividade nucleásica da Taq polimerase cliva o probe e libera um fragmento que contém o corante repórter, que não será mais bloqueado pelo corante silenciador (b e c). A fluorescência emitida é medida pelo aparelho e utilizada para a quantificação do gene alvo amplificado. Ilustrações extraídas do Manual de RQ-PCR da Applied Biosystems.

As vantagens em relação aos métodos anteriores são: maior sensibilidade e acurácia, maior rapidez, menor competição de produtos com diferentes tamanhos e exclusão de sinais não específicos^{42,43}.

Um dos métodos para avaliação do quimerismo que utiliza o RQ-PCR é a amplificação de “single nucleotide polymorphisms” (SNP), que são variantes dialélicas que diferem entre si somente em um único nucleotídeo. Isso os torna mais fáceis de genotipar do que os marcadores VNTR e STR, que exibem polimorfismos de comprimento e, portanto, requerem métodos de genotipagem com separação por tamanho⁴¹. O limite de detecção do quimerismo por esta técnica é de 0,1-0,0001%, significativamente maior que o do STR-PCR^{41,44,45}. No entanto, o método requer a identificação de pequenas diferenças entre alelos, o que reduz a sua habilidade discriminativa e aumenta a complexidade do teste.

Foram descritos também polimorfismos de inserção/deleção (indels) dialélicos, que são baseados na inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos^{44,52,53}. A maioria dos indels dialélicos são aqueles com diferença de comprimento entre os alelos de relativamente poucos nucleotídeos. Há poucos estudos com o uso de indels na avaliação do quimerismo pós-TCTH, e somente um deles avaliou prospectivamente uma série de 61 pacientes transplantados por leucemia aguda e os resultados foram comparados àqueles obtidos pela técnica de PCR convencional com marcadores VNTR. A sensibilidade foi de, pelo menos, 0,01%, com boa concordância intra- e inter-teste e alta acurácia. O teste foi informativo, ou seja, foram encontrados polimorfismos presentes nos receptores e ausentes nos doadores, em 80,3% dos pacientes. Os pacientes que não recaíram mostraram diminuição progressiva dos valores de quimerismo periférico até valores menores de 0,01% (quimerismo completo). Foi observado aumento do quimerismo prévio à recaída em 88,2% dos pacientes. Comparado ao método convencional de PCR por amplificação de VNTR, esta técnica de RQ-PCR pôde prever a recaída em um número muito maior de pacientes (88,2 vs 44,4%) com a antecipação mediana de 58 dias⁵⁴.

O pacientes transplantados na Unidade de TCTH do Hospital das Clínicas da UNICAMP têm o quimerismo pós-transplante monitorizado pela técnica de VNTR e, caso este seja positivo, é utilizado o STR. Notamos muitos casos de recidiva hematológica que não são detectadas previamente pelo quimerismo. Surgiu, então,

a hipótese que gerou este trabalho: se pudéssemos reproduzir na população de pacientes transplantados no Hospital das Clínicas da UNICAMP a técnica de polimorfismos indels por RQ-PCR, a sua implementação poderia auxiliar no diagnóstico e tratamento precoces da recidiva pós-transplante.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a factibilidade e a reprodutibilidade da técnica de quantificação do quimerismo usando amplificação por PCR quantitativo em tempo real de polimorfismos de inserção/deleção (indels) na população de pacientes transplantados no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Os objetivos secundários foram avaliar se os pacientes que apresentaram recaída pós-transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas poderiam ter sido identificados mais precocemente pela técnica de quantificação do quimerismo por PCR em tempo real em comparação ao método padrão (VNTR) e avaliar o risco de recaída em relação à cinética do quimerismo e aos dados clínicos dos pacientes.

3. METODOLOGIA

3.1. SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram selecionados, retrospectivamente, 44 pacientes adultos (maiores de 18 anos) com diagnóstico de leucemia aguda, leucemia crônica ou síndrome mielodisplásica submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas de doador compatível, aparentado ou não, independentemente do regime de condicionamento usado, transplantados entre 2005 e 2010.

Todos os pacientes tinham avaliações de quimerismo pós-transplante em pelo menos 3 momentos distintos. As amostras de sangue periférico e de medula óssea destes pacientes estavam congeladas a -20°C e foram separadas e armazenadas pelo número e pelas iniciais do paciente. Dos 44 pacientes inicialmente selecionados, 3 não possuíam amostras antes do TCTH em quantidades suficientes para os testes e foram, portanto, excluídos da análise.

Foi feita uma ficha com os dados clínicos que seriam compilados para posterior análise estatística (**Anexo 1**).

3.2. ANÁLISE DO QUIMERISMO

3.2.1. Quantificação do DNA para análise

O primeiro procedimento para a análise das amostras foi a quantificação da concentração de DNA das mesmas. Utilizamos o aparelho *Thermo Scientific Q3 Nanodrop 1000* (Wilmington, DE, USA), onde uma amostra de apenas $1\mu\text{l}$ é pipetada em placas de poços, em cujo fundo está a extremidade de um cabo de fibra óptica (fibra receptora). Um segundo cabo de fibra óptica (cabo fonte) entra em contato com a amostra líquida, por cima, ficando alinhado ao cabo da primeira fibra ótica. A amostra fica, assim, entre as duas fibras óticas. Uma lâmpada de *xenon* pulsada promove a fonte de luz e um espectrofotômetro analisa a luz que passa pela amostra e determina a concentração de DNA⁵⁵. A pequena quantidade de amostra necessária foi uma grande vantagem, pois nossas amostras pré-

transplante e algumas pós-transplante tinham volume pequeno. A concentração foi expressa em nanogramas/ μl (ng/ μl).

3.2.2. AVALIAÇÃO DO QUIMERISMO PELA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RQ-PCR)

As reações de RQ-PCR foram realizadas com a tecnologia TaqMan, descrita anteriormente^{50,51}, no aparelho ABI Q2 Prism 7500 da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Os kits foram fornecidos pela empresa Sistemas Genómicos (Valencia, Espanha) e continham os primers e os probes para a reação de PCR. No total, 13 sequências de polimorfismos indels foram analisadas: SRY, GSTM1, MID154, MID1385, MID1039, MID1732, MID2113, XQ28, rs4399, MID-2062, FVII, MID-1066 e THRY.

As amostras foram analisadas com os 13 polimorfismos e também com o gene da β -globina, sempre em duplicata e com um controle negativo. A β -globina é um gene que funciona como controle de qualidade da amostra, ou seja, se a amostra não amplifica adequadamente o gene da β -globina, é provável que o DNA não esteja com boa qualidade. É o controle positivo das amostras. Se a amostra não amplificasse adequadamente o gene da β -globina não poderiam ser aceitos os testes realizados com o polimorfismo naquela amostra.

Antes de iniciarmos o trabalho com as amostras de pacientes, um teste para avaliar a quantidade de DNA a ser usada nas reações de PCR foi realizado. A quantidade de DNA para a quantificação do quimerismo pelo VNTR é de 300 ng/ μl . Em protocolos publicados que utilizaram a técnica de polimorfismos indels foram usados 100 ng de DNA^{44,54}. Como tínhamos pouco volume nas amostras pré e em algumas pós-TCTH e não poderíamos obter mais material, fizemos uma análise da qualidade da amplificação com diferentes quantidades de DNA, para definirmos se uma quantidade menor de DNA seria suficiente para os testes. Para este teste de quantidade de DNA usamos o gene da β -globina. Esta análise serviu também para nos habituarmos com o método.

Preparamos a amostra de acordo com a instrução do manual dos kits de polimorfismo⁵⁷ conforme descrito abaixo, com volume final de 10 μl :

- a) 2µl de DNA: amostras pré TCTH de 2 pacientes nas quantidades de 100, 50, 25 e 12,5 ng/µl.
- b) 3 µl do kit de primers e probes para o gene da β-globina.
- c) 5 µl de Master Mix: usamos o Maxima Probe qPCR Master Mix (2X), fornecido pela empresa Sinapse Biotecnologia (São Paulo, Brasil). O Master Mix continha a enzima Maxima® Hot Start Taq DNA polymerase e desoxirribonucleotídeos (dNTPs) em uma solução tampão (contendo KCl e (NH₄)₂SO₄)⁵⁶

As amostras foram colocadas em duplicata em uma placa óptica com 96 poços. Uma amostra para controle negativo sem o DNA também foi utilizado. A amplificação foi realizada no aparelho ABI Q2 Prism 7500 da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), seguindo o programa especificado na Tabela 3⁵⁷.

Tabela 3. Amplificação e aquisição de dados

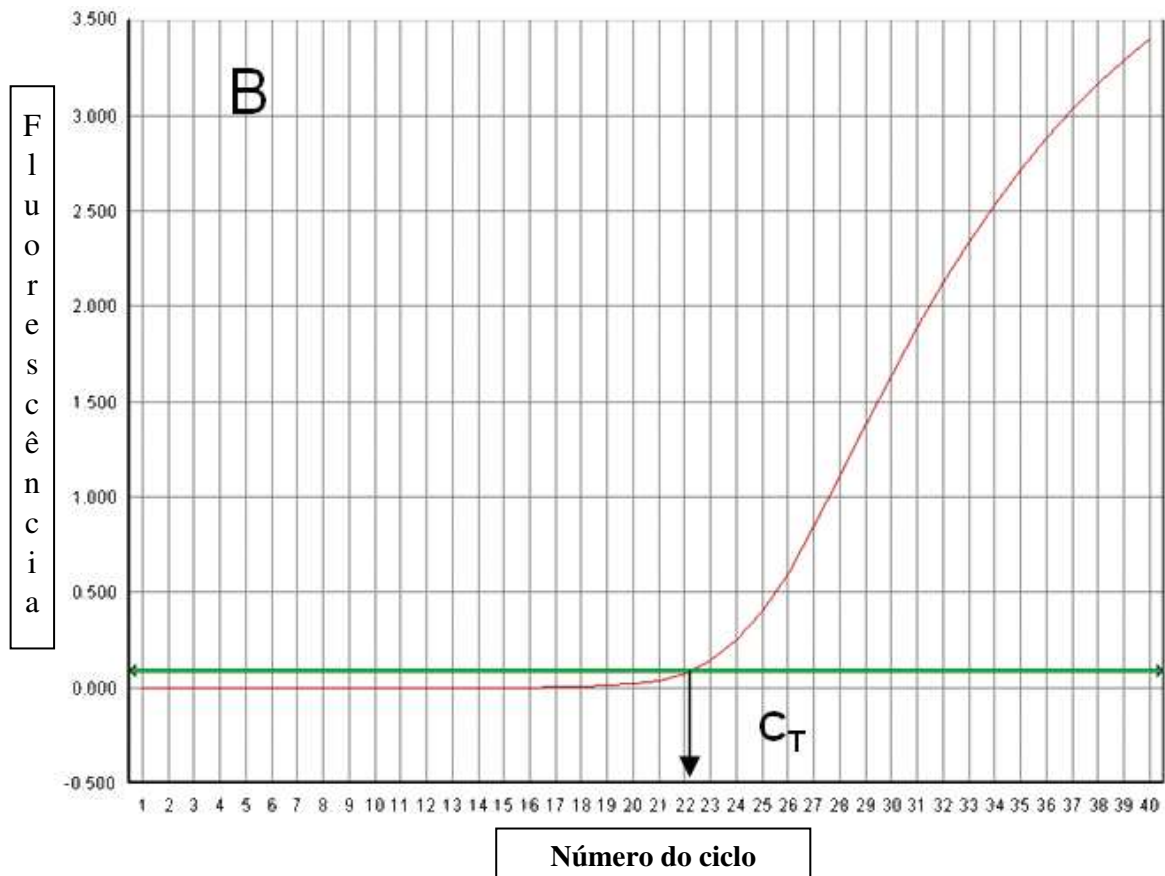
Passo	Temperatura	Tempo	Aquisição de dados	Ciclos
1	95°C	10 minutos	Não	1
2	95°C	15 segundos	Não	50
3	58°C	30 segundos	Não	
4	72°C	30 segundos	Sim	

Durante os ciclos, conforme o DNA era amplificado, o aparelho mostrava, em tempo real, a curva de amplificação. Para cada amostra, o aparelho ABI Q2 Prism 7500 produziu uma curva relacionando a intensidade do sinal de fluorescência (ΔR_n) com o número do ciclo. O valor ΔR_n corresponde à variação na intensidade da fluorescência durante cada ciclo de PCR, normalizada pela fluorescência de uma referência interna passiva (ROX).

Um Ct (*cycle threshold*, ciclo limiar) foi determinado para cada amostra. O Ct é definido como o número do ciclo no qual um aumento significativo da fluorescência é primeiro detectado. Ele é inversamente proporcional à quantidade

de DNA alvo na amostra, ou seja, quanto menor o Ct, maior a quantidade do DNA alvo na amostra. Um exemplo pode ser visto na Figura 8.

Figura 8. Exemplo de curva de amplificação por RQ-PCR



Neste exemplo o C_t foi de 22, ou seja, no ciclo 22 houve o crescimento exponencial da amplificação do gene.

No nosso teste, todas as quantidades de DNA foram amplificadas, porém o teste não ficou com boa qualidade, pois havia muito ruído e algumas duplicatas não coincidiram. Repetimos o teste com a adição da solução ROX, da seguinte forma: 2 μ l de DNA, 3 μ l do kit com o gene da β -globina, 6 μ l de Master Mix, 0,15 μ l de ROX e 0,85 μ l de água estéril. A solução ROX é um corante que serve como uma referência interna para normalização do sinal de fluorescência. Permite a correção de variações entre os poços que podem ocorrer por diferenças na iluminação e na captação da fluorescência dos poços da extremidade da placa, bem como para corrigir variações de pipetagem ou flutuações da fluorescência. A ROX não participa

do PCR e tem um espectro de emissão diferente comparado aos corantes usados nos probes. Repetimos os testes com esta modificação e a amplificação das quantidades crescentes de DNA coincidiu com uma regressão linear e com boa coincidência entre as replicadas em todas as concentrações testadas. O resultado da amplificação estava dentro dos padrões de qualidade especificados no manual ($Ct < 25$), conforme será descrito adiante, exceto para a amostra com 12,5 ng de DNA que estava discretamente acima deste valor ($Ct = 25,9$).

3.2.3. AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS PRÉ-TRANSPLANTE

As amostras pré-transplante dos receptores e dos doadores foram testadas para os 13 polimorfismos. Para a pesquisa do polimorfismo utilizamos a quantidade de 25ng de DNA do paciente e do doador, conforme descrito anteriormente. O polimorfismo foi considerado informativo quando estava presente no receptor e ausente no doador.

3.2.4. AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS PÓS-TRANSPLANTE

As amostras pós-transplante foram testadas da mesma forma, utilizando os polimorfismos encontrados na primeira etapa. Metade dos pacientes tinha mais de um polimorfismo informativo e, nestes casos, foram feitas as análises com, no máximo, 2 polimorfismos em todas as amostras. Para as amostras pós-transplante utilizamos 100ng de DNA. Esta quantidade de DNA representa, aproximadamente, 17.000 células na amostra (cada célula tem aproximadamente 6 pg de DNA), ou seja, daria ao teste a sensibilidade de $1,7 \times 10^{-4}$. Esta foi a sensibilidade encontrada no estudo clínico que descreveu esta técnica de polimorfismos indels⁵⁴. Além das amostras pós-transplante, a amostra pré-transplante do receptor também foi novamente analisada para uso como calibrador, conforme descrito a seguir.

A quantidade de quimerismo foi obtida pelo método da quantificação relativa, onde o valor do Ct deve ser normalizado de acordo com a quantidade efetiva de DNA em cada amostra. Isto é feito usando-se o Ct da referência ativa (gene da β -globina) da amostra em questão. Além disso, a amostra pré-TCTH do

receptor foi novamente avaliada e usada como amostra calibradora (considerado 100% positivo para o polimorfismo).

Em resumo, para quantificar o quimerismo, é necessário saber o Ct da amostra (pós-TCTH) e do calibrador (amostra do receptor, considerado 100% positivo para o polimorfismo) para o gene alvo (polimorfismo) e para o gene referência (β -globina). Com estes valores, a seguinte fórmula foi aplicada⁵⁷:

$$\frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}} (Ct_{\text{cal}} - Ct_{\text{amostra}})}}{(E_{\text{referência}})^{\Delta Ct_{\text{ref}} (Ct_{\text{cal}} - Ct_{\text{amostra}})}}$$

E= eficiência; alvo= polimorfismo estudado; cal= calibrador (amostra pré-TCTH do paciente); amostra= amostra pós-TCTH; referência = gene da β -globina

Os valores de eficiência da amplificação de cada gene foram os fornecidos pelo fabricante⁵⁷, conforme **Tabela 4**.

Tabela 4. Eficiência de amplificação de cada gene

Polimorfismo	Eficiência
SRY	1,98
GSTM1	2,00
MID154	2,02
MID1385	1,93
MID1039	1,93
MID1732	1,90
MID2113	1,97
XQ28	2,04
RS4399	1,94
MID2062	1,97
FVII	1,99
MID1066	2,07
THRY	2,04
B-GLOBINA	1,96

Os valores da quantificação do quimerismo foram expressos em porcentagem, correspondendo à proporção de DNA do receptor na amostra pós-transplante.

Na **Tabela 5** abaixo está um exemplo de como foram tabulados os resultados dos testes para o cálculo do quimerismo em todas as amostras. ACB é um paciente com leucemia mieloide aguda que foi submetido ao transplante alogênico não mieloablativo. Este paciente não recidivou e, em sua última avaliação disponível, sua situação era de vivo e em remissão completa.

Tabela 5. Resultados dos testes nas amostras de um paciente

Paciente	Dia da amostra	Polimorfismo 1 (Eficácia= 2)	Ct	% de Quimerismo
ACB	Pré	GSTM1	22,44666	
ACB	51	GSTM1	26,44322	7,1
ACB	65	GSTM1	27,63744	7,13
ACB	71	GSTM1	27,55577	2,63
ACB	112	GSTM1	31,67489	0,2
ACB	140	GSTM1	34,4056	0,04
ACB	224	GSTM1	36,16683	0,009
ACB	322	GSTM1	35,96706	0,01

Amostras avaliadas com o polimorfismo GSTM1

Paciente	Dia da amostra	Polimorfismo 2 (Eficácia= 1,98)	Ct	% de Quimerismo
ACB	Pré	SRY	22,58618	
ACB	51	SRY	26,73724	6,65
ACB	65	SRY	27,85049	7,15
ACB	71	SRY	28,2003	1,96
ACB	112	SRY	31,86304	0,21
ACB	140	SRY	35,32407	0,02
ACB	224	SRY	36,95307	0,006
ACB	322	SRY	35,94657	0,01

Amostras avaliadas com o polimorfismo SRY

Paciente	Dia da amostra	Gene referência (Eficiência= 1,96)	Ct
ACB	Pré	β -Globina	22,29939
ACB	51	β -Globina	22,48629
ACB	65	β -Globina	23,72297
ACB	71	β -Globina	22,15862
ACB	112	β -Globina	22,59854
ACB	140	β -Globina	23,03291
ACB	224	β -Globina	22,59483
ACB	322	β -Globina	22,6308

Amostras avaliadas com o gene da β -Globina. Notar que todos os Cts estão abaixo de 25, que é o nível de corte para inferir DNA e replicação de boa qualidade.

Aplicando-se a fórmula para a primeira amostra no dia 51 pós-transplante com o polimorfismo GSTM1 temos:

$$\frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta C_{t_{\text{alvo}} (C_{t_{\text{cal}} - C_{t_{\text{amostra}})}}}}}{(E_{\text{referência}})^{\Delta C_{t_{\text{ref}} (C_{t_{\text{cal}} - C_{t_{\text{amostra}})}}}}} \rightarrow \frac{(2)^{\Delta C_{t_{\text{alvo}} (22,44666 - 26,44322)}}}{(1,96)^{\Delta C_{t_{\text{ref}} (22,29939 - 22,48629)}}$$

$$\frac{2^{-3,99656}}{1,96^{-0,1869}} \rightarrow \frac{0,062649}{0,881815} = 0,071046 = 7,1\%$$

Este cálculo foi feito para todas as amostras e, desta forma, obtivemos os valores de quimerismo pós-transplante.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O primeiro passo foi realizar a análise descritiva de todas as variáveis estudadas, e as que se destacaram foram representadas por gráficos e tabelas.

A fim de investigar as correlações clínicas com os resultados de quimerismo obtidos, os testes de correlação de Pearson e Spearman foram aplicados, respeitando a natureza de cada variável.

As variáveis quantitativas foram avaliadas através do teste Mann-Whitney ou teste t, quando cotejadas entre os grupos de pacientes que tiveram ou não recaída, respeitando os pressupostos exigidos de cada teste. Para as variáveis categóricas os testes chi-quadrado ou Fisher foram aplicados, de acordo com suas implicações.

O método Kaplan-Meier⁵⁸ foi aplicado para obter as curvas de sobrevida. Para a sobrevida global, o cálculo do tempo considerou a data do diagnóstico até a data da última consulta ou data do óbito. O evento foi o óbito por qualquer causa. Para a sobrevida livre de doença (SLD), o tempo foi calculado somente para os pacientes que conseguiram obter remissão completa, sendo o período compreendido entre a data de remissão e a data da recaída ou data do óbito ou data da última consulta. Os eventos para SLD foram recaída ou óbito por doença⁵⁹. A comparação das curvas foi feita por meio do teste log-rank⁶⁰⁻⁶².

Para todas as análises o sintótico considerado significativo foi o $p < 0.05$. As análises foram realizadas usando o software SPSS (statistical package for social sciences, SPSS 21.0, IBM systems,) e alguns gráficos foram feitos usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

5. RESULTADOS

Os seguintes dados clínicos dos pacientes foram coletados e estão apresentados na **Tabela 6**: sexo, idade, doença de base, tipo de condicionamento, tipo de enxerto utilizado, profilaxia usada para a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), número de células infundidas, tempo da pega de neutrófilos, tempo da pega de plaquetas, número total de dias de internação e tipo de recidiva pós-TCTH (precoce ou tardia). A mediana de idade dos pacientes foi de 42 anos, com variação de 23 a 65 anos, e aproximadamente 58% eram do sexo feminino.

As leucemias agudas foram a principal indicação de transplante, em 63% dos pacientes, seguidas pela LMC que representou 26,8% dos casos. Aproximadamente 10% foram transplantados por SMD. Os condicionamentos mieloablativos foram realizados em 80% dos casos e a profilaxia da DECH mais utilizada foi a combinação de metotrexate e ciclosporina, em 83% dos pacientes. Todos os transplantes foram de doadores aparentados e totalmente compatíveis (irmão/irmã), e a maioria (63% dos casos) recebeu células obtidas do sangue periférico.

Do total de 41 pacientes analisados, 17 (41,5%) recidivaram após o transplante. A grande maioria destes, ou seja, 13 pacientes (76,5%), apresentou recaídas muito precoces, nos primeiros 6 meses de seguimento, e 1 paciente recidivou com 1 ano. Outros 3 foram recidivas tardias, após 1 ano de transplante.

Tabela 6. Dados clínicos dos pacientes

Total de pacientes analisados (n)	41
Sexo (%)	
Masculino	41,5
Feminino	58,5
Idade ao transplante, mediana (variação)	42,5 (23-65)
Diagnóstico (%)	
LLA	14,6
LMA	48,8
LMC	26,8
SMD	9,8
Tipo de condicionamento (%)	
Mieloablativo	80,5
Não mieloablativo/RIC	19,5
Tipo de enxerto (%)	
Medula óssea	36,6
Sangue periférico	63,4
Profilaxia para DECH (%)	
MTX+CsA	82,9
MMF+CsA	17,1
Células nucleadas infundidas, mediana (variação)	4,26 (1,51-24,14)
Células CD34+ infundidas, mediana (variação)	3,62 (0,62-7,55)
Dia de pega de granulócitos, mediana (variação)	16 (10-31)
Dia de pega de plaquetas, mediana (variação)	18 (8-35)
Dias de internação (mediana, variação)	21 (12-58)
Recidiva pós-transplante (n)	
Precoce (≤ 1 ano)	14
Tardia (> 1 ano)	03

LLA: leucemia linfóide aguda; LMA: leucemia mieloide aguda; LMC: leucemia mieloide crônica; SMD: síndrome mielodisplásica; DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro; MTX: metotrexate; CsA: ciclosporina A; MMF: micofenolato mofetil.

Células nucleadas estão expressas como $\times 10^9/\text{kg}$ de peso do receptor
Células CD34+ estão expressas como $\times 10^6/\text{kg}$ de peso do receptor

Dos 41 pacientes, 34 (83%) possuíam polimorfismos informativos, ou seja, que estavam presentes no receptor e ausentes no doador. Destes, 17 possuíam apenas um polimorfismo informativo, 12 possuíam 2 polimorfismos, 3 possuíam 3 polimorfismos e 2 possuíam 4 polimorfismos informativos. Estes dados estão de acordo com dados da literatura, que encontrou polimorfismos informativos em 80,3% dos pares receptor/doador testados⁵⁴.

A **Tabela 7** abaixo mostra a frequência dos polimorfismos estudados.

Tabela 7. Frequência de polimorfismos informativos

Polimorfismo	Pacientes n (%)
MID2113	8 (19,5%)
MIDFVII	7 (17%)
MID1385	7 (17%)
RS4399	6 (15%)
GSTN1	5 (12%)
THRY	5 (12%)
SRY	4 (10%)
MID1732	4 (10%)
MID154	3 (7%)
MID1039	3 (7%)
MID2062	3 (7%)
XQ28	2 (5%)
MID1066	1 (2%)

Dos 34 pacientes que apresentaram polimorfismos informativos, 2 foram excluídos na segunda fase de análise das amostras pós-transplante: 1. um paciente foi excluído pois havia sido transplantado em 1999 e, apesar de ter 4 amostras analisadas para quimerismo, estas haviam sido colhidas mais de 10 anos pós-transplante; 2. um paciente não apresentou mais o polimorfismo que havia sido encontrado na amostra pré-TCTH. Sua amostra pré-TCTH e a do seu doador foram novamente testadas para os 13 polimorfismos e nenhum informativo foi encontrado.

Dos 32 pacientes analisados, 15 (46,9%) haviam recaído após o transplante, a maioria (11 pacientes; 73,3%), deles em até seis meses. Um paciente recaiu aos 12 meses e 3 recaíram após 12 meses do transplante. Desta forma, foram analisadas as amostras coletadas até 1 ano pós-transplante de todos os pacientes e, dois dos pacientes que recaíram após 1 ano tiveram suas amostras analisadas até a recaída. O terceiro paciente que recaiu após 1 ano só tinha amostras até 1 ano pós-TCTH. Conforme já foi demonstrado em diversos estudos com pacientes transplantados por leucemia, a situação da doença antes do transplante é importante para o resultado do tratamento. Na população estudada observamos a mesma correlação, ou seja, o grupo de pacientes recidivados foi transplantado em fases mais avançadas da doença em relação ao grupo que não recidivou, conforme demonstrado na **Tabela 8**. Foram consideradas doenças precoces as leucemias agudas em primeira remissão completa ou a LMC em fase crônica. Todas as outras situações, como as leucemias agudas refratárias, em recidiva ou em segunda remissão, e as LMCs em fase acelerada ou crise blástica foram consideradas doenças avançadas.

Tabela 8. Situação da doença de base antes do transplante e correlação com resultados do transplante (grupo de pacientes recidivados versus não recidivados)

Situação da doença pré-transplante	n
Grupo com recidiva	15
1RC / Fase crônica	6
Não 1RC / Fase crônica	9
Grupo sem recidiva	17
1RC / Fase crônica	15
Não 1RC / Fase crônica	2

1RC: primeira remissão completa

Os 32 pacientes possuíam, pelo menos, 3 amostras pós-transplante analisáveis e a mediana foi de 7,5 amostras/paciente (3-22). Na **Tabela 9** pode-se visualizar a distribuição das amostras coletadas até 6 meses por paciente e seus respectivos status pós-TCTH. Como pode ser observado, os momentos de coleta das amostras apresentaram grande variabilidade entre os pacientes. Esta variabilidade se refletiu também nos resultados, inclusive quando estratificados pelo tempo e o tipo de doença.

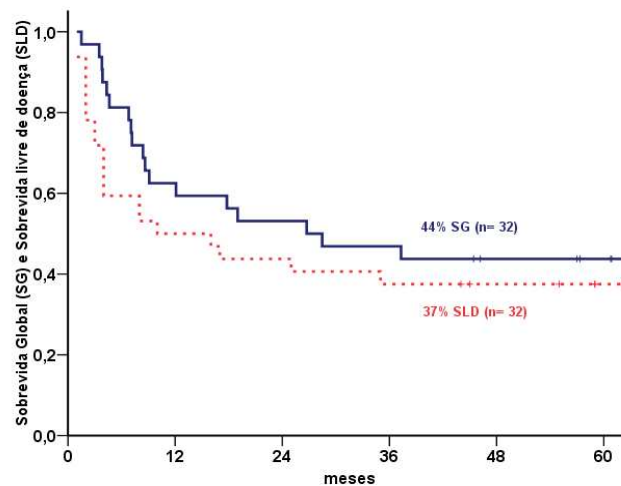
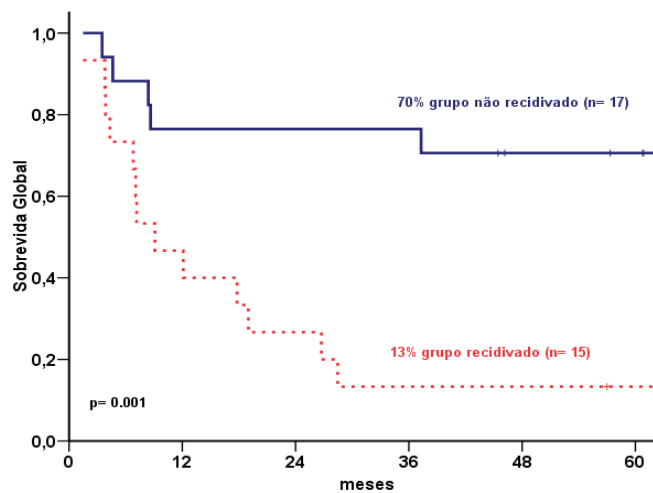
Tabela 9. Número de amostras para análise até 6 meses pós-TCTH e situação dos 32 pacientes analisados

#	Iniciais	Doença	Mês da coleta						N. coletas	Recaída	Mês da recaída	Situação, status da doença, mês de seguimento
			1	2	3	4	5	6				
1	ASB	LMA	*		*	*	*	*	+1	sim	12	vivo, PD, 57
2	AMOS	SMD	*		*		*	*		sim	6	morto, PD, 7
3	APGS	LMC	*	*	*	*	*	*	+2	não		vivo, RC, 57
4	ASS	LMA	*		*		*			não		morto, RC, 8
5	ACB	LMA		*	*	*	*	*	+2	não		vivo, RC, 93
6	AR	LMC		*	*	*	*	*	+4	não		morto, RC, 37
7	CLD	LMC	*	*	*	*	*	*		não		vivo, RC, 65
9	CAFC	LMC	*	*		*	*	*		não		vivo, RC, 77
11	CBFB	LMA	*	*	*	*	*	*		sim	2	morto, PD, 7
12	CCL	LMC	*	*	*	*	*	*	+4	sim	5	morto, PD, 98
13	ESS	LMA			*	*				sim	3	morto, PD, 4
14	ERC	LLA		*	*		*	*		não		morto, RC, 9
17	FFMF	LMC	*		*	*	*	*	+2	não		vivo, RC, 67
18	GAJ	LMC			*	*				não		morto, RC, 4
19	IC	SMD		*	*	*	*	*		sim	5	morto, PD, 9
20	JWG	LMA	*	*	*					sim	3	morto, PD, 4
22	MSG	LLA	*		*	*	*	*	+2	sim	16	morto, PD, 28
23	MCJ	LMA	*	*	*	*				não		morto, RC,5
24	MDP	LMA	*		*	*	*	*	+1	não		vivo, RC, 46
25	MLOS	LMC	*				*	*		não		vivo, RC, 101
28	MCGM	LMA	*	*	*	*	*	*	+13	não		vivo, RC, 70
29	NRS	LMA	*						+2	sim	1	morto, PD, 2
30	POF	LLA	*	*	*	*	*	*	+4	sim	18	morto, PD, 19
31	PAAN	SMD	*	*	*	*	*	*	+1	sim	4	morto, PD, 7
33	SAAC	LLA	*	*	*	*				sim	3	morto, PD, 18
34	SMACO	LLA	*	*	*	*				sim	3	morto, PD, 4
35	SSML	LMA	*	*	*	*	*	*	+3	não		vivo, RC, 61
36	SRLS	LMA		*	*	*	*	*	+3	não		vivo RC, 61
37	TCSP	LMA			*	*	*	*	+3	não		vivo, RC, 45
38	TRMZ	LMA	*	*	*	*	*	*		sim	4	morto, PD, 12
39	TAS	LMA	*	*	*	*	*	*	+4	sim	25	morto, PD, 27
41	WC	LMA		*		*	*	*	+2	não		vivo, RC, 70

LMA: leucemia mieloide aguda; SMD: síndrome mielodisplásica; LMC: leucemia mieloide crônica; LLA: leucemia linfóide aguda; PD: progressão de doença; RC: remissão completa. N. coletas = coletas além dos 6 meses

A sobrevida global mediana dos pacientes que recaíram foi de 9 (2-98) meses e, ao final do período de observação, somente um (6,6%) permanecia vivo. A maioria (86,6%) dos óbitos se deu por progressão da doença. No total, 5 (29,4%) dos pacientes que não recaíram morreram, 4 deles em até 9 meses após o transplante, a maioria (4 pacientes, 80%) por complicações infecciosas. Na **Figura 9** estão as curvas de Kaplan-Meier da Sobrevida Global (SG) e da Sobrevida Livre de Doença (SLD). A sobrevida global em 5 anos no grupo que não recaiu foi significativamente maior do que no grupo que recaiu ($p= 0,001$, teste de *log-rank*). Nota-se também que a curva da SLD é muito próxima à da SG, o que reflete a alta mortalidade nos pacientes que apresentam recidiva da doença.

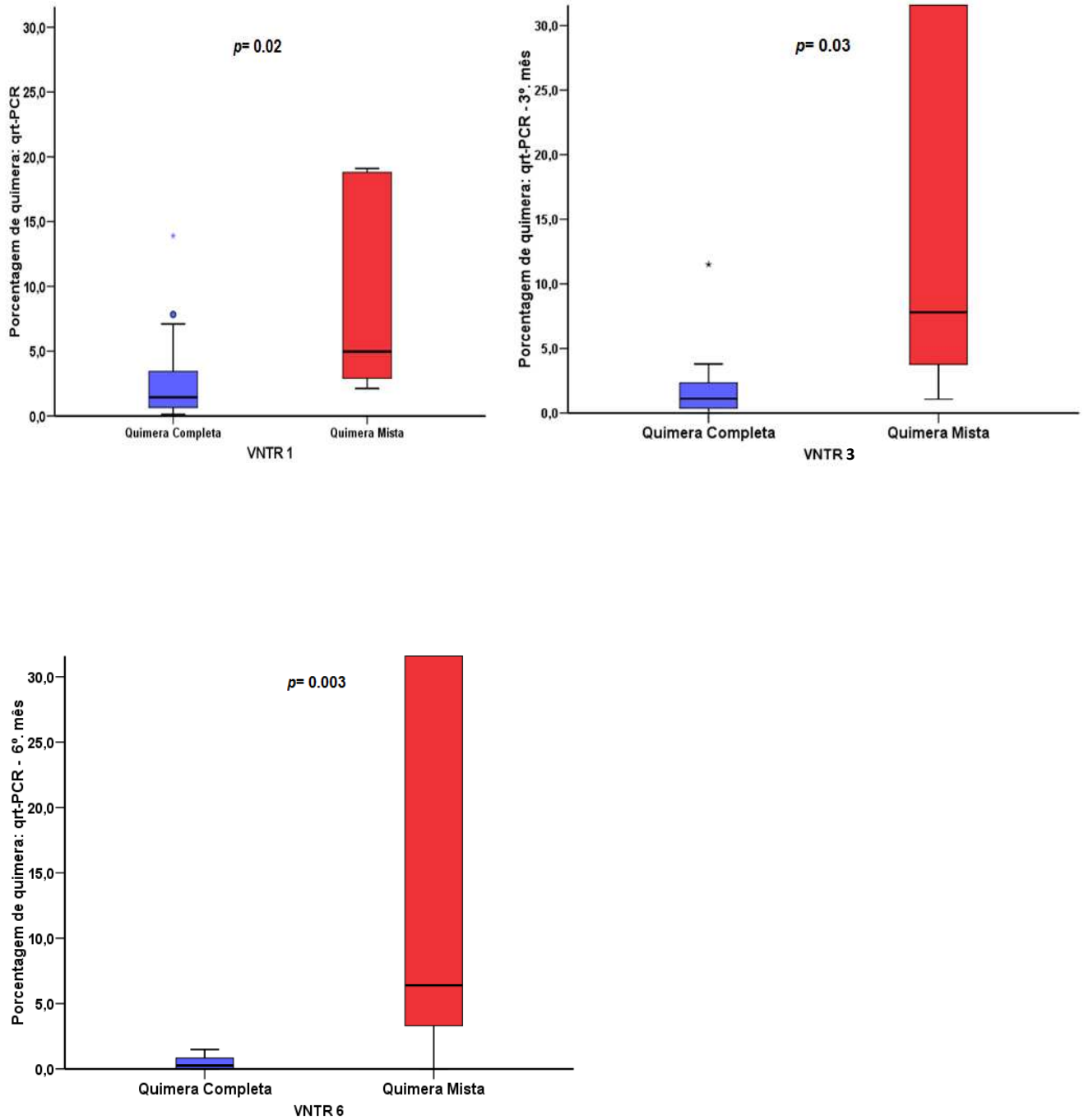
Figura 9. Curvas de Kaplan-Meier da Sobrevida Global e da Sobrevida Livre de Doença



Foram analisadas 249 amostras pós-TCTH, das quais mais de 99% eram provenientes de sangue periférico. Foi possível quantificar quase todas as amostras com o método de RQ-PCR, que foi altamente sensível, atingindo o nível mínimo de detecção de 0,01%. Somente as amostras do paciente POF apresentaram erro. Em várias de suas amostras o valor do quimerismo excedeu os 100%, o que é um valor não real já que o máximo é 100%. Isto se deveu, provavelmente, à má qualidade das amostras. Quando analisamos o gene da β -globina, o controle de qualidade do DNA, observamos que a qualidade da amplificação do DNA de quase todas as amostras deste paciente não foi boa, confirmando esta hipótese de erro por má qualidade do DNA.

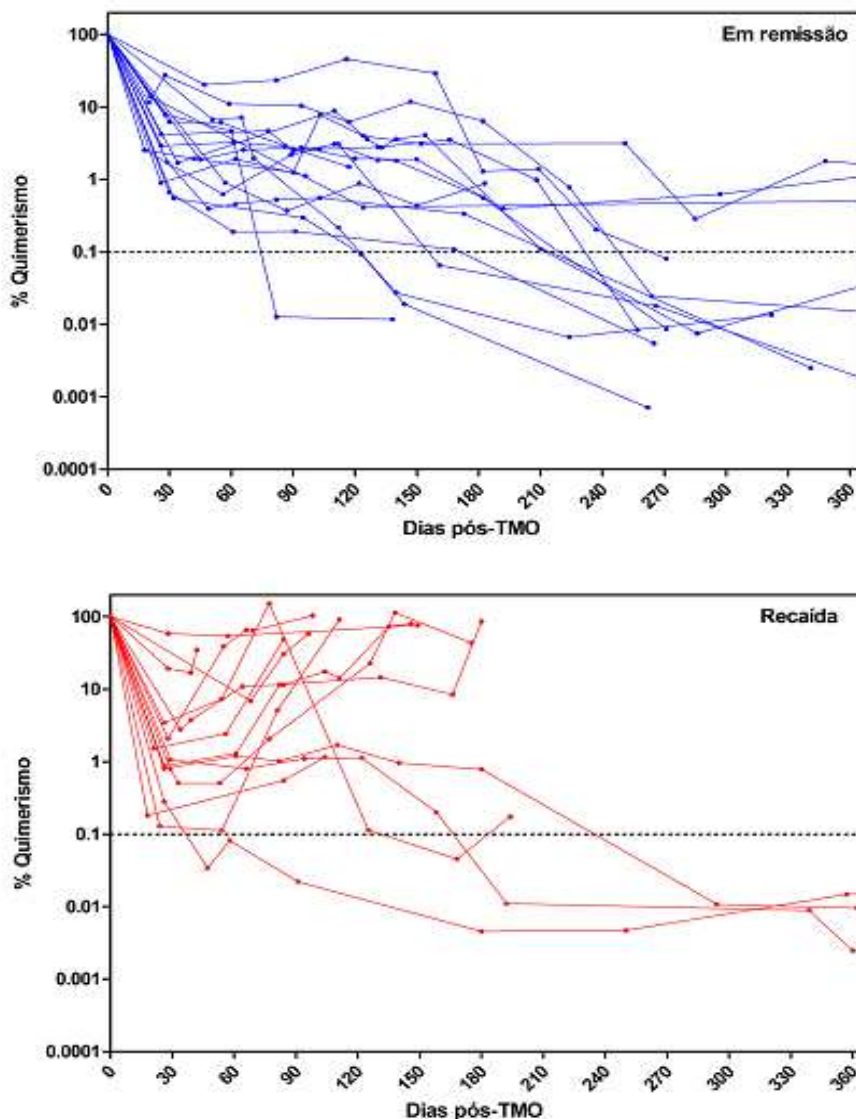
Os valores que encontramos pelo método de PCR quantitativo em tempo real foram, primeiramente, correlacionados com o teste de quimerismo padrão utilizado na instituição, que é o VNTR (qualitativo). Alguns casos de quimera mista foram analisados também pelo STR (quantitativo), mas o teste não estava disponível na maioria das amostras. Conforme demonstrado na **Figura 10** pôde-se constatar boa correlação entre as técnicas, ou seja, quando o VNTR demonstrava quimerismo completo, os valores do RQ-PCR estavam baixos, e quando o VNTR demonstrava quimerismo misto, os valores do RQ-PCR estavam altos, evidenciando maior quantidade de células do receptor em meio às células do doador no quimerismo misto. Isto confirmou que a técnica, além de detectar o quimerismo em todas as amostras, o fez adequadamente ao se correlacionar bem com o padrão utilizado. A quantificação do quimerismo conseguiu distinguir os grupos com quimera completa ou mista.

Figura 10. Porcentagem de quimera pelo RQ-PCR e correlação com quimera completa ou mista pelo VNTR nos meses 1, 3 e 6 pós-transplante.



Além das quantificações pontuais do quimerismo, que permitem avaliar, em um determinado momento no tempo pós-transplante, se há evidência de células do receptor e a sua quantidade, é importante avaliar a cinética do quimerismo. A cinética permite observar se ocorre um período de quimera mista que vai sendo progressivamente substituída por células do doador ou se, ao contrário, há o aumento das células do receptor, o que é um preditor importante de recidiva da doença. Conforme demonstrado na **Figura 11**, a cinética do quimerismo mostrou-se bastante diferente entre os grupos de pacientes recidivados e não recidivados.

Figura 11. Cinética do quimerismo hematopoiético pós-transplante em pacientes recidivados e não recidivados.



O grupo de recidivados apresentou queda abrupta inicial e, posteriormente, o aumento muito rápido e precoce do quimerismo previamente à recaída hematológica. Enquanto o grupo que não recidivou apresentou, inicialmente, uma queda menos intensa, porém progressiva da porcentagem de células do receptor, seguida pela sua diminuição lenta e contínua ao longo do tempo. Embora não tenha sido possível encontrar um valor de corte no nível de quimerismo que pudesse ser preditivo de recaída, a diferença na cinética foi evidente. Curiosamente, observamos um período mediano de aproximadamente 6 meses para o quimerismo alcançar níveis abaixo de 0,1% no grupo de pacientes não recidivados.

Tentamos correlacionar a cinética do quimerismo com o risco de recaída e o diagnóstico de base, mas não conseguimos encontrar nenhuma significância estatística. É evidente, no entanto, que os pacientes que recaem têm um aumento muito precoce da população de células do receptor. Entre 6-8 semanas após o TCTH começamos a observar uma diferença nos níveis de quimerismo, mas provavelmente devido ao número limitado da amostra, não houve significância estatística, e somente uma tendência após 12-14 semanas do TCTH ($p= 0,06$). O tempo mediano para a recaída hematológica foi de 18 semanas. Este dado poderia explicar a falta de resposta à infusão de linfócitos do doador nos cinco pacientes que foram submetidos a esta terapia de resgate após a detecção da quimera mista pelo VNTR/STR e todos faleceram por progressão da doença.

Não foi possível correlacionar os valores do quimerismo com nenhum outro parâmetro clínico. As amostras eram heterogêneas quanto ao momento da coleta e o número de pacientes foi provavelmente insuficiente para demonstrarmos diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes recidivados e não recidivados com base nos valores de quimerismo. É necessário que seja avaliado um maior número de pacientes dentro de um estudo prospectivo.

6. DISCUSSÃO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas é uma modalidade terapêutica importante no manejo das doenças oncohematológicas. Sua vantagem terapêutica resulta não somente da possibilidade de permitir maior intensidade do tratamento quimioterápico mas também do efeito antineoplásico mediado pelas células do enxerto. Evidências clínicas do efeito enxerto versus leucemia foram observadas inicialmente em estudos retrospectivos, que mostravam menor incidência de recidiva nos pacientes que apresentavam a doença do enxerto contra o hospedeiro. A partir daí, a importância das células T foi reconhecida, os mecanismos da DECH e do EVL foram estudados e diversas modalidades terapêuticas, como a ILD, o uso de citocinas, os transplantes não mieloablativos, entre outros, foram desenvolvidas para explorar este importante mecanismo imunológico de combate à neoplasia. Ainda assim, muitos pacientes recidivam sem dar tempo de oferecer o tratamento de resgate adequado.

Este estudo nasceu de uma sensação de enorme impotência frente à rápida recidiva da doença após o transplante sem que pudéssemos tê-la previsto e prevenido. Sentíamos que precisávamos ser mais rápidos que a doença, detectá-la quando ela ainda estivesse muito incipiente para não deixá-la progredir. Na época, estavam sendo publicados diversos estudos com RQ-PCR e o método de polimorfismos indels havia sido publicado recentemente com resultados expressivos. Foi possível prever a recaída em um número muito maior de pacientes (88,2 vs 44,4%) em relação ao VNTR com a antecipação mediana de 58 dias⁵⁴. Decidimos então avaliar a factibilidade e a reprodutibilidade desta técnica nos pacientes transplantados na UNICAMP.

O primeiro obstáculo foi conseguir os primers e probes dos polimorfismos indels. Nenhuma empresa nacional os produzia. Encontramos um fabricante na Espanha, a empresa Sistemas Genómicos (Valencia, Espanha), que poderia fornecer o material, mas então surgiu o segundo obstáculo: o preço. Com o financiamento da FAPESP pudemos importar e iniciar o estudo.

O terceiro desafio surgiu com o desenho do estudo. Por ser retrospectivo, teríamos que usar as amostras que estavam armazenadas. Nem todas as amostras que haviam sido analisadas no passado estavam ainda presentes. Dos 41 pacientes

selecionados, 3 tiveram que ser excluídos pois não tinham mais amostras pré-transplante disponíveis. O momento da coleta e o número de amostras eram muito diferentes entre os pacientes. O volume, em alguns casos, era muito pequeno e não tínhamos a possibilidade de conseguir novas amostras. Um importante ponto positivo era que tínhamos um número bastante grande de amostras e, conhecendo este montante, pudemos programar adequadamente os teste de acordo com a necessidade do método, a importância clínica que pretendíamos e o nosso orçamento.

Os primeiros dados clínicos dos pacientes já confirmaram a importância deste estudo. Dos 41 pacientes selecionados, 41,5% haviam recidivado após o transplante. Interessante observar que as recidivas foram, em sua grande maioria, muito precoces, 76,4% em até 6 meses pós transplante. Outro dado importante em relação às recidivas foi a situação da doença antes do transplante. Já é bem conhecido, e nosso estudo confirmou, que pacientes transplantados com doença avançada têm maior risco de recidivar. Reconhecer isto já é um importante mecanismo de prevenção de recidivas, ou seja, quanto melhor a avaliação pré-transplante e os critérios utilizados para garantir que o paciente será submetido ao tratamento em uma condição favorável, melhores serão os resultados, independentemente de métodos diagnósticos modernos no pós-transplante.

A técnica de quimerismo por PCR quantitativo em tempo real de polimorfismos de inserção/deleção dialélicas foi prática e rápida, além de muito precisa na detecção do quimerismo pós-TCTH. Estas características a qualificam para o monitoramento deste grupo de pacientes com leucemias, que precisam de um teste rápido e preciso para detecção de doença residual ou recidivante.

A primeira análise, onde avaliamos a presença dos 13 polimorfismos nos pares receptor-doador, foi realizada com uma quantidade pequena de DNA, de 25ng, se considerarmos que os principais métodos de PCR convencional e em tempo real utilizam 100-500ng. Um estudo recém publicado⁶³ avaliou 16 pares receptor-doador e, também por ser um estudo retrospectivo e com pequeno volume de amostra, testou quantidades menores de DNA. Foram usados 5ng de DNA nas amostras pré-TCTH e 20ng nas amostras pós-TCTH com boa amplificação e Cts médios de 28,05. Os testes de eficácia dos primers/probes neste estudo determinaram o Ct máximo de 36 como adequado. O kit de polimorfismos que

usamos determinavam o Ct máximo de 25 na amplificação da β -globina como controle de qualidade do DNA. Portanto, optamos por usar 25ng de DNA pois com 12,5ng o Ct estava discretamente acima deste valor (Ct = 25,9). A amplificação do DNA em nossas amostras foi adequada e a taxa de informatividade de 83% é comparável ao que foi descrito em literatura⁵⁴. Esta qualidade de amplificação em quantidades relativamente pequenas de DNA confirma a sensibilidade e a acurácia da técnica. Como já foram descritos mais de 2000 polimorfismos indels^{52,64}, é possível e necessário incluir novos primers para estes polimorfismos na prática clínica para aumentar a informatividade do método.

A análise das amostras pós-TCTH para 1 ou 2 polimorfismos informativos demonstrou que o método foi capaz de detectar níveis muito baixos de células do receptor nesta população de pacientes estudada. Houve boa correlação dos valores obtidos com o RQ-PCR e os resultados do VNTR. Não foi possível fazer uma comparação estatística entre os métodos, não somente por se tratarem de técnicas muito diferentes, sendo o VNTR um teste qualitativo, mas principalmente pela heterogeneidade das amostras. Provavelmente, um estudo prospectivo com maior número de pacientes seria capaz de demonstrar diferenças significativas, conforme um estudo publicado⁵⁴. Embora não tenha sido possível determinar um valor de corte do quimerismo que pudesse ser preditivo de recidiva, a técnica demonstrou que a cinética do quimerismo foi muito diferente entre os pacientes recidivados e não recidivados, e algumas observações importantes puderam ser feitas.

Os pacientes que recidivaram tiveram uma queda abrupta do quimerismo logo após o transplante, conforme o esperado. No entanto, precocemente, o quimerismo já apresentou um aumento muito rápido. Logo após 6-8 semanas do TCTH começamos a observar uma diferença nos níveis de quimerismo, mas provavelmente devido ao número limitado da amostra, não houve significância estatística, e somente uma tendência após 12-14 semanas do TCTH ($p = 0,06$). O tempo mediano para a recaída hematológica foi de 18 semanas. Isto ajuda a explicar porque não houve resposta à infusão de linfócitos do doador nos 5 pacientes que foram submetidos a esta terapia de resgate após a detecção da quimera mista pelo VNTR/STR e todos faleceram por progressão da doença. A intervenção precoce, imediatamente após a evidência de recaída, é crucial para o prognóstico nesta população de pacientes. Como o método de RQ-PCR foi capaz de identificar estes aumentos precoces do quimerismo, e que culminaram em recidivas hematológicas

precoces, podemos inferir que estes pacientes mantiveram uma carga tumoral residual que foi refratária ao condicionamento. Talvez a ILD profilática pudesse ser mais eficaz nestes casos com evidência de doença residual tão precoce. Dois trabalhos recentes^{4,65}, um deles de revisão, avaliaram o papel da ILD profilática em pacientes com alto risco de recidiva. O primeiro⁶⁵ avaliou a ILD profilática em pacientes transplantados com regime de condicionamento mieloablativo para leucemia aguda refratária. A ILD era realizada no dia +60 pós-transplante se o paciente não tivesse DECH aguda grau \geq II, independentemente da doença residual mínima. Caso o paciente tivesse DECH aguda no D+30 ou DECH aguda grau \geq II no D+60, receberia ILD no D+90 caso a doença residual mínima fosse positiva e não tivesse mais DECH. Os pacientes que receberam a ILD profilática tiveram menor taxa de recidiva (22.7% vs 33.9%, $P=0.048$) e maior sobrevida (58.1% vs 54.9%, $P=0.043$) do que os pacientes que não receberam a DLI. O segundo trabalho⁴ fez uma revisão de estudos que utilizaram ILD com diferentes modificações do procedimento. Em relação à ILD profilática, avaliou 4 estudos que demonstraram redução das recidivas pós-transplante.

O grupo que não recidivou apresentou, inicialmente, uma queda menos intensa porém progressiva da porcentagem de células do receptor, seguida pela sua diminuição lenta e contínua ao longo do tempo. Houve um período mediano longo, de aproximadamente 6 meses, para o quimerismo alcançar níveis abaixo de 0,1% neste grupo de não recidivados. Há ainda poucos estudos publicados com o uso dos indels para a avaliação longitudinal do quimerismo pós-TCTH^{63,66-69} e algumas questões importantes permanecem sem respostas e necessitam de maior investigação. É possível que as células remanescentes do receptor nos primeiros 6 meses pós-transplante, conforme observado no grupo não recidivado, tenham sido responsáveis por desencadear um efeito EVL mais eficiente? Estas células residuais são células normais ou leucêmicas? A quimera mista inicial poderia ser benéfica? As células do receptor que predominam ainda após o condicionamento poderiam ser responsáveis pelos resultados do transplante? Foi relatado, por exemplo, que os filtros usados na coleta da medula óssea podem conter uma média de 21% de células iniciadoras de colônias de longa duração e 15% de unidades formadoras de colônias de fibroblastos do total de células progenitoras e que a adição destas células à medula coletada reduziu significativamente a incidência de DECH graus II-IV e a mortalidade relacionada ao transplante⁷⁰. Estes dados reforçam a importância

das outras células da medula óssea, tais como as células mesenquimais, no mecanismo da pega.

A avaliação do quimerismo em níveis tão baixos poderia nos ajudar a compreender este complexo mecanismo onde células geneticamente distintas interagem em diversas situações pós-transplante. Isto poderia também levar à maior otimização dos atuais regimes não mieloablativos para obtermos melhores efeitos EVL com menores efeitos adversos.

Como relatado anteriormente, uma limitação importante do seu uso é o custo. Os kits de polimorfismo usados foram importados e não existem disponíveis no mercado nacional. No entanto, a maioria destes polimorfismos está descrito em literatura e seu sequenciamento é conhecido. Como vimos que a técnica funciona, um próximo passo seria a produção destes polimorfismos para podermos ampliar a amostra de pacientes e, posteriormente, usá-los na prática clínica.

7. CONCLUSÃO

A técnica de quimerismo por PCR quantitativo em tempo real de polimorfismos indels é factível e foi reprodutível no grupo de pacientes transplantados em nossa instituição. Quase todas as amostras puderam ser amplificadas e analisadas de forma adequada. A técnica é simples e demonstrou boa correlação com o padrão utilizado.

Não foi possível estabelecer um ponto de corte no valor do quimerismo que pudesse ser preditivo do risco de recidiva da doença após o transplante, mas a técnica foi capaz de detectar o aumento progressivo do quimerismo nos pacientes que recidivaram e demonstrou que a cinética do quimerismo é bastante diferente entre os grupos de pacientes recidivados e não recidivados. É necessário ampliar o número de pacientes no estudo para demonstrarmos a correlação dos valores de quimerismo com as variáveis clínicas e tentar encontrar um valor de corte que seja indicativo de alto risco de recidiva.

8. REFERÊNCIAS

1. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36: 757-769.
2. Frassoni F, Labopin M, Gluckman E, Prentice HG, Vernant JP, Zwaan F, et al. Results of allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia have improved in Europe with time--a report of the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17(1): 13-8.
3. El-Jawahri A, Li S, Antin JH, Spitzer TR, Armand PA, Koreth J, et al. Improved Treatment-Related Mortality and Overall Survival of Patients with Grade IV Acute GVHD in the Modern Years. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016; 22(5): 910-8.
4. Chang X, Zang X, Xia CQ. New strategies of DLI in the management of relapse of hematological malignancies after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation.* 2016; 51(3): 324-32.
5. Rivera GK, Pinkel D, Simone JV, Hancock ML, Crist WM. Treatment of acute lymphoblastic leukemia: 30 years' experience at St Jude Children's Research Hospital. *New Engl J Med.* 1993; 329: 1289-95.
6. Luger SM, Ringdén O, Zhang MJ, Pérez WS, Bishop MR, Bornhauser M. Similar outcomes using myeloablative vs reduced-intensity allogeneic transplant preparative regimens for AML or MDS. *Bone Marrow Transplant.* 2012; 47(2): 203-11.
7. Mohty M, Labopin M, Volin L, Gratwohl A, Socié G, Esteve J et al. Reduced-intensity versus conventional myeloablative conditioning allogeneic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 2010; 116(22): 4439-43.

8. Eapen M, Giralt SA, Horowitz MM, Klein JP, Wagner JE, Zhang MJ, et al. Second transplant for acute and chronic leukemia relapsing after first HLA-identical sibling transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 34(8): 721-7.
9. Bosi A, Laszlo D, Labopin M, Reffeirs J, Michallet M, Gluckman E, et al. Second Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Acute Leukemia: Results of a Survey by the European Cooperative Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol.* 2001; 19(16): 3675-84.
10. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res.* 1965; 25: 1525-30.
11. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic effects of graft versus host disease in human recipients of allogeneic marrow grafts. *N Engl J Med.* 1979; 300: 1068-70.
12. Rodt H, Kolb HJ, Netzel B, Rieder I, Janka G, Belohradsky B, et al. GVHD suppression by incubation of bone marrow grafts with anti-T-cell globulin: effect in the canine model and application to clinical bone marrow transplantation. *Transplant Proc.* 1979;11: 962-6.
13. Kolb HJ, Rieder I, Rodt H, Netzel B, Grosse-Wilde H, Scholz S, et al. Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation: VI. Graft versus host tolerance in DLA-incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with absorbed antithymocyte globulin. *Transplantation.* 1979; 27: 242-5.
14. Marks DI, Lush R, Cavenagh J, Milligan DW, Schey S, Parker A, et al. The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2002;100: 3108-14.
15. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nature Reviews Cancer.* 2004; 4: 371-80.
16. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood.* 2008; 112(12): 4371-83.
17. Barrett AJ. Mechanisms of the Graft-versus-Leukemia Reaction. *Stem Cells.* 1997; 15: 248-58.

18. Simula MP, Markt S, Fozza C, Kaeda J, Szydlo RM, Nadal E, et al. Response to donor lymphocyte infusions for chronic myeloid leukemia is dose-dependent: the importance of escalating the cell dose to maximize therapeutic efficacy. *Leukemia*. 2007; 21(5): 943-8.
19. Michallet AS, Nicolini F, Fürst S, Le QH, Dubois V, Hayette S, et al. Outcome and long-term follow-up of alloreactive donor lymphocyte infusions given for relapse after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantations (HSCT). *Bone Marrow Transplant*. 2005; 35(6): 601-8.
20. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, et al. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995; 86(5): 2041-50.
21. Huff CA, Fuchs EJ, Smith BD, Blackford A, Garrett-Mayer E, Brodsky RA, et al. Graft-versus-host reactions and the effectiveness of donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006; 12(4): 414-21.
22. Takami A, Okumura H, Yamazaki H, Kami M, Kim SW, Asakura H, et al. Prospective trial of high-dose chemotherapy followed by infusions of peripheral blood stem cells and dose-escalated donor lymphocytes for relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2005; 82(5): 449-55.
23. Formánková R, Sedláček P, Krsková L, Ríhová H, Srámková L, Stary J for the Czech Pediatric Hematology Working Group. Chimerism-directed adoptive immunotherapy in the prevention and treatment of post-transplant relapse of leukemia in childhood. *Haematologica*. 2003; 88: 117-8.
24. Radujkovic A, Guglielmi C, Bergantini S, Iacobelli S, van Biezen A, Milojkovic D, et al; Chronic Malignancies Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Donor Lymphocyte Infusions for Chronic Myeloid Leukemia Relapsing after Allogeneic Stem Cell Transplantation: May We Predict Graft-versus-Leukemia Without Graft-versus-Host Disease? *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015; 21(7): 1230-6.
25. Ogawa H, Tsuboi A, Oji Y, Tamaki H, Soma T, Inoue K, et al. Successful donor leukocyte transfusion at molecular relapse for a patient with acute myeloid

- leukemia who was treated with allogeneic bone marrow transplantation: importance of the monitoring of minimal residual disease by WT1 assay. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21(5): 525-7.
26. Sanchez J, Serrano J, Gomez P, Martinez F, Martin C, Madero L, et al. Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic transplantation. *Br J Haematol.* 2002; 116(3): 686-94.
 27. Dey BR, McAfee S, Colby C, Sackstein R, Saidman S, Tarbell N, et al. Impact of prophylactic donor leukocyte infusions on mixed chimerism, graft-versus-host disease, and antitumor response in patients with advanced hematologic malignancies treated with nonmyeloablative conditioning and allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003; 9(5): 320-9.
 28. Bader P, Kreyenberg HW, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol.* 2004; 22: 1696-1706.
 29. Vigorito AC, de Souza CA. Hematopoietic stem cell transplant and recovery of hematopoiesis. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009; 31(4): 280-4.
 30. Barrios M, Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Madrigal E, Castillejo JA, Torres A et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica.* 2003; 88: 801-10.
 31. Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R et al. 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.* 1998; 21: 487-95.
 32. Thiede C, Bornhäuser M, Ehninger G. Strategies and Clinical Implications of Chimerism Diagnostics after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Acta Haematol.* 2004; 112: 16-23.

33. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation*. 2005; 35: 107-19.
34. Schaap N, Schattenberg A, Bär B, Mensink E, de Man A, Geurts van Kessel A, et al. Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor lymphocyte infusion. *Br J Haematol*. 2000; 108: 116-25.
35. Van Dijk BA, Drenthe-Schonk AM, Bloo A, Kunst VA, Janssen JT, de Witte TJ. Erythrocyte repopulation after allogeneic bone marrow transplantation. Analysis using erythrocyte antigens. *Transplantation*. 1987; 44: 650-4.
36. Casarino L, Carbone C, Capucci MA, Izzi T, Ferrara GB. Analysis of chimerism after bone marrow transplantation using specific oligonucleotide probes. *Bone Marrow Transplant*. 1992; 10: 165-70.
37. Offit K, Burns JP, Cunningham I, Jhanwar SC, Black P, Kernan NA, et al. Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood*. 1990; 75: 1346-55.
38. Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Varus E, Beelen DW, Schaefer UW, et al. Dynamics of lineage-restricted mixed chimerism following sex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation. *Histol Histopathol*. 2003; 18: 557-74.
39. Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Varus E, Schneider C, Müller H, et al. Mixed chimerism of erythro- and megakaryopoiesis following allogeneic bone marrow transplantation. *Acta Haematol*. 2003; 109: 176-83.
40. Mattson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J, Ringde´n O. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2001; 15: 1976-85.
41. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Quantitative Analysis of Chimerism after Allogeneic Stem Cell Transplantation by Real-Time Polymerase Chain Reaction with Single Nucleotide Polymorphisms, Standard

- Tandem Repeats, and Y-Chromosome-Specific Sequences. *American Journal of Hematology*. 2006; 81: 735-46.
42. Wittwer C. Rapid cycle real-time PCR: methods and applications. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. *Rapid Cycle Realtime PCR: Methods and Applications*. Berlin: Springer-Verlag, 2001, pp. 1–8.
 43. Oliver DH, Thompson RE, Griffin CA, Eshleman JR. Use of single nucleotide polymorphisms (SNP) and real-time polymerase chain reaction for bone marrow engraftment analysis. *J Mol Diagn*. 2000; 2: 202-8.
 44. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*. 2002; 99: 4618-25.
 45. Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Bunō I, Dolstra H et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by realtime PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia*. 2003; 17: 621-9.
 46. Bryant E, Martin PJ. Documentation of Engraftment and Characterization of Chimerism Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In Blume KG, Forman SJ, Applebaum FR, editors. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004, pp. 197-207.
 47. Knowlton RG, Brown VA, Braman JC, Barker D, Schumm JW, Murray C, et al. Use of highly polymorphic DNA probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood*. 1986; 68: 378-85.
 48. van Tol MJ, Langlois van den Bergh R, Mesker W, Ouwerkerk-van Velzen MC, Vossen JM, Tanke HJ. Simultaneous detection of X and Y chromosomes by two-colour fluorescence in situ hybridization in combination with immunophenotyping of single cells to document chimaerism after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 21: 497-503.
 49. Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplantation*. 2004; 34: 1-12.

50. Heid CA, Stevens J, Livak KL, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6: 986-94.
51. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Applic.* 1995; 4: 357-62.
52. Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 854-62.
53. Wilhelm J, Reuter H, Tews B, Pingoud A, Hahn M. Detection and quantification of insertion/deletion variations by allele-specific real-time PCR: application for genotyping and chimerism analysis. *Biol Chem.* 2002; 383: 1423-33.
54. Jiménez-Velasco A, Barrios M, Román-Gómez J, Navarro G, Buño I, Castillejo JA, et al. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia.* 2005;19:336-43.
55. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. Wilmington (DE): Thermo Scientific. 2008.
56. Maxima Probe qPCR Master Mix (2X), ROX Solution provided, Product Information. Foster City (CA): Thermo Scientific. 2011.
57. AutentiGEN® CHIMERISM Oligonucleotide set for the quantification of hematopoietic chimerism. Valencia: Sistemas Genómicos. 2009.
58. Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observation". *Journal of the American Statistics Association.* 1958; 53: 457-81.
59. Kim H T, Armand P. Clinical Endpoints in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Studies: The Cost of Freedom. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19: 860-66.
60. Bustamante-Teixeira MT, Faerstein E, Latorre, MR. "Técnicas de análise de sobrevivência". Rio de Janeiro: Cad Saúde Pública. 2002; 18(3): 579-594.

61. Lee TE, Wang WJ. *Statistical Methods for Survival Data Analysis*, 3rd ed. Hoboken: Wiley Interscience, 2003, p.534.
62. Gouvea GDR, Oliveira FLP, Vivanco MJF. "Análise de eventos competitivos: uma aplicação aos dados de hemodiálise da cidade de Lavras-MG". *Rev Bras Biom.* 2009; 27(3): 491-500.
63. Bach C, Tomova E, Goldmann K, Weisbach V, Roesler W, Mackensen A, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism by real-time quantitative PCR of micro insertions/deletions in samples with low DNA quantities. *Transfus Med Hemother.* 2015; 42(1): 38-45.
64. Bhangale TR, Rieder MJ, Livingston RJ, Nickerson DA. Comprehensive identification and characterization of diallelic insertion–deletion polymorphisms in 330 human candidate genes. *Human Molecular Genetics.* 2005; 14(1): 59-69.
65. Xuan L, Fan Z, Zhang Y, Zhou H, Huang F, Dai M, et al. Sequential intensified conditioning followed by prophylactic DLI could reduce relapse of refractory acute leukemia after allo-HSCT. *Oncotarget.* 2016; 11. [Epub ahead of print]
66. Jacque N, Nguyen S, Golmard JL, Uzunov M, Garnier A, Leblond V, et al. Chimerism analysis in peripheral blood using indel quantitative real-time PCR is a useful tool to predict post-transplant relapse in acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50(2): 259-65.
67. Kim SY, Jeong MH, Park N, Ra E, Park H, Seo SH, et al. Chimerism monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using quantitative real-time PCR of biallelic insertion/deletion polymorphisms. *J Mol Diagn.* 2014; 16(6): 679-88.
68. Santurtún A, Riancho JA, Yañez L, Santurtún M, Zarrabeitia MT. Analysis of post-transplant chimerism by using a single amplification reaction of 38 Indel polymorphic loci. *Bone Marrow Transplant.* 2014; 49(11):1432-5.
69. Kletzel M, Huang W, Olszewski M, Khan S. Validation of chimerism in pediatric recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) a comparison between two methods: real-time PCR (qPCR) vs. variable number tandem repeats PCR (VNTR PCR). *Chimerism.* 2013; 4(1):1-8.

70. Vicente D, Podestà M, Pitto A, Pozzi S, Lucchetti S, Lamparelli T et al. Progenitor cells trapped in marrow filters can reduce GvHD and transplant mortality. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 38: 111–17.

9. ANEXOS

9.1. Ficha de dados clínicos

9.2. Tabela com os dados dos pacientes

9.3. Carta de aprovação do estudo no CEP

9.4. Versão do artigo publicado na revista BMT

9.5. *License to publish* – autorização para o autor utilizar o artigo em teses

9.1. Ficha de dados clínicos

Dados clínicos dos pacientes a serem compilados e inseridos em uma planilha para análise:

- Número do paciente: número de 3 dígitos atribuído ao paciente para identificação do mesmo;
- Sexo do paciente
- Idade do paciente no dia do TMO em anos;
- Diagnóstico da doença de base;
- Tipo de doador: aparentado ou não aparentado
- Tipo de condicionamento: ablativo ou não mieloablativo
- Tipo de enxerto: medula óssea, células progenitoras periféricas, sangue de cordão
- Data de internação do paciente para realizar o condicionamento;
- Data do primeiro dia do TMO (o primeiro D+0);
- Data da alta hospitalar;
- Número de células nucleadas infundidas;
- Número de células CD34+ infundidas;
- Qual profilaxia de DECH usada
- Grau da DECH aguda, se ocorreu (varia de 0 a 4 + NA= não avaliável);
- Dia em que ocorreu a DECH aguda
- Se ocorreu DECH crônica
- Dia em que foi analisada a DECH ou o dia em que foi diagnosticada
- Dia da pega de granulócitos (2 dias consecutivos de neutrófilos > 500);
- Dia da Pega de plaquetas > 20.000, respeitando 7 dias sem transfusão de plaquetas;
- Se apresentou recidiva ou progressão;
- Data da recidiva, progressão ou rejeição;
- Situação da doença na data da última consulta ou óbito;
- Situação: se vivo ou se óbito
- Data do óbito
- Causa do óbito

9.2. Tabela com os dados dos pacientes

NP	Sexo	Idade	Diagnóstico	Tipo de doador	HLA	Transpl	En	Internação	TMO	Alta	Cls Nucl	CD34+	Dia da pega de neutrófilos	Dia da pega de plaquetas	NP	ProfDECH	DECHa	DiaDECHa	DECHc	DiaDECHc	Rec	Data Rec	StatusDi	Sit	Óbito	Causa
728	M	22,6	LMA	Ap	6/6	AL	CPP	14/07/09	23/07/09	07/08/09	4,59	3,07	11	15	728	CyA	2	84	2	327	S	21/07/10	RC	V		
730	F	44,3	SMD	Ap	6/6	AL	CPP	18/08/09	27/08/09	22/09/09	7,72	2,37	24	15	730	CyA	0	100	0	194	S	23/02/10	recidiva	M	27/03/10	Rec
685	F	34,4	LMC	Ap	6/6	AL	CPP	19/08/08	28/08/08	15/09/08	3,33	2,48	15	15	685	CyA	0	100	2	201	N		RC	V		
624	F	57,8	LMA	Ap	6/6	RIC	CPP	17/04/07	24/04/07	06/05/07	24,14	4,6	12	9	624	MMF	2	75	2	101	N		RC	M	01/01/08	Infec
564	M	62,1	LMA	Ap	6/6	RIC	CPP	17/01/06	24/01/06	10/02/06	9,41	2,64	14	0	564	MMF	2	78	2	86	N		RC	V		
764	M	65,2	LMC	Ap	6/6	RIC	CPP	10/08/10	19/08/10	08/09/10	4,26	3,99	18	13	764	CyA	0	100	2	179	N		RC	M	11/09/13	Infec
691	M	46,8	LMC	Ap	6/6	AL	MO	07/10/08	16/10/08	10/11/08	2,55	1,06	19	20	691	CyA	0	100	2	211	N		RC	V		
550	M	29,8	LMC	Ap	6/6	AL	CPP	18/10/05	27/10/05	12/11/05	7,02	5,57	14	17	550	CyA	0	100	2	131	N		RC	M	12/04/06	DECHc
614	F	35,6	LMC	Ap	6/6	AL	CPP	25/01/07	02/02/07	24/02/07	4,11	2,79	16	26	614	CyA	0	100	0	2301	N		RC	V		
690	M	31,2	LMC	Ap	6/6	AL	MO	24/09/08	01/10/08	22/10/08	2,64	2,03	15	17	690	CyA	0	100	2	265	N		RC	V		
714	F	38,8	LMA	Ap	6/6	AL	MO	03/03/09	12/03/09	17/04/09	2,46	3,17	19	22	714	CyA	0	77			S	28/05/09	recidiva	M	13/10/09	Rec
473	F	34,4	LMC	Ap	6/6	RIC	CPP	10/05/04	18/05/04	31/05/04	6,88	6,51	6	0	473	MMF	0	100	0	176	S	26/10/04	RC	M	30/05/12	DECHc
756	F	28,8	LMA	Ap	6/6	AL	CPP	02/06/10	10/06/10	07/07/10	8,16	3,99	17	21	756	CyA	2	20			S	14/09/10	PD	M	04/10/10	Rec
763	M	45,7	LLA	Ap	6/6	AL	CPP	29/07/10	09/08/10	08/09/10	3,54	3,07	24	23	763	CyA	0	100	2	204	N		RC	M	25/04/11	DECHc
206	F	33,0	LMA	Ap	6/6	AL	MO	19/10/99	28/10/99	17/11/99	2,8	3,97	20	20	206	CyA	0	100	1	495	N		RC	V		
568	M	47,5	LMC	Ap	6/6	AL	CPP	13/02/06	23/02/06	27/03/06	2,82	2,32	31	23	568	CyA	0	100	2	230	N		RC	V		
671	M	35,1	LMC	Ap	6/6	AL	CPP	15/04/08	24/04/08	15/05/08	3,08	3,58	20	19	671	CyA	0	100	2	306	N		RC	V		
539	F	26,0	LMC	Ap	6/6	AL	CPP	10/08/05	18/08/05	02/09/05	5,1	5,7	10		539	CyA	0	100			N		RC	M	01/12/05	SPI
680	F	65,4	SMD	Ap	6/6	RIC	CPP	15/07/08	23/07/08	19/09/08	6,02	4,12	14	21	680	MMF	0	100	0	125	S	05/01/09	recidiva	M	22/04/09	Rec
737	M	48,7	LMA	Ap	6/6	AL	CPP	03/11/09	11/11/09	02/12/09	4,45	4,24	18	15	737	CyA	0	99			S	01/02/10	recaída	M	21/03/10	Rec
681	M	53,7	LMA	Ap	6/6	AL	MO	15/07/08	31/07/08	05/09/08	4,46	3,64	18	24	681	CyA	0	74			S	07/10/08	PD	M	13/10/08	Rec
759	M	34,7	LLA	Ap	6/6	AL	CPP	22/06/10	05/07/10	23/07/10	4,97	5,83	12	16	759	CyA	0	100	2	171	S	23/11/11	recidiva	M	05/11/12	Rec
664	F	51,8	LMA	Ap	6/6	RIC	CPP	26/02/08	11/03/08	31/03/08	10,89	3,77	19	11	664	MMF	2	84	0	139	N		RC	M	28/07/08	Infec
753	F	51,7	LMA	Ap	6/6	AL	CPP	13/04/10	22/04/10	18/05/10	6,16	7,55	11	14	753	CyA	0	100	2	265	N		RC	V		
547	F	43,6	LMC	Ap	6/6	AL	MO	05/10/05	13/10/05	30/10/05	3,5	1,61	15	21	547	CyA	2	35	2	101	N		RC	V		
401	F	56,2	SMD	Ap	6/6	RIC	CPP	13/12/07	20/12/07	10/01/08	6,67	2,78	10	8	401	MMF	2	98	2	315	N		RC	V		
678	F	44,0	LMA	Ap	6/6	AL	MO	01/07/08	10/07/08	04/08/08	3,37	3,27	14	18	678	CyA	0	100	1	138	N		RC	V		
643	M	55,6	LMA	Ap	6/6	AL	MO	02/10/07	11/10/07	08/11/07	3,42	3,9	16	19	643	CyA	0	100	2	251	N		RC	V		

NP	Sexo	Idade	Diagnóstico	Tipo de doador	HLA	Transpl	En	Internação	TMO	Alta	Cl _s Nucl	CD34+	Dia da pega de neutrófilos	Dia da pega de plaquetas	NP	ProfDECH	DECHa	DiaDECHa	DECHc	DiaDECHc	Rec	Data Rec	StatusDi	Sit	Óbito	Causa
672	M	25,4	LMA	Ap	6/6	AL	MO	06/05/08	15/05/08	12/06/08	2,66	3,16	21	35	672	CyA					S	27/06/08	RC	M	29/06/08	Rec
736	M	32,8	LLA	Ap	6/6	AL	CPP	20/10/09	29/10/09	19/11/09	2,48	2,89	13	11	736	CyA	0	100	2	131	S	26/04/11	recidiva	M	22/05/11	Rec
719	M	42,5	SMD	Ap	6/6	AL	MO	07/04/09	16/04/09	15/05/09	4,89	0,62	26	33	719	CyA	0	100			S	20/08/09	recidiva	M	06/11/09	Rec
711	F	29,5	LMA	Ap	6/6	AL	MO	10/02/09	19/02/09	18/03/09	1,76	2,9	18	30	711	CyA					S	04/05/09	PD	M	27/07/10	Rec
636	F	40,9	LLA	Ap	6/6	AL	CPP	05/09/07	14/09/07	05/10/07	7,52	4,63	13	18	636	CyA	0	100	0	116	S	31/12/07	recidiva	M	01/03/09	Rec
618	F	50,4	LLA	Ap	6/6	AL	MO	19/02/07	01/03/07	21/03/07	1,51	4,01	16	22	618	CyA	3	55			S	19/06/07	recidiva	M	23/06/07	Rec
657	F	41,8	LMA	Ap	6/6	AL	MO	15/01/08	24/01/08	16/02/08	2,4	1,14	16	23	657	CyA	0	100	2	376	N		RC	V		
699	F	48,5	LMA	Ap	6/6	AL	CPP	02/12/08	15/12/08	01/01/09	7,57	4,22	17	11	699	CyA	0	100	2	176	N		RC	V		
726	F	44,4	LMA	Ap	6/6	AL	MO	05/08/09	13/08/09	03/09/09	2,79	4,3	16	16	726	CyA	0	100	1	440	N		RC	V		
634	F	45,2	LMA	Ap	6/6	RIC	CPP	05/07/07	17/07/07	15/08/07	4,07	3,62	27	21	634	MMF	3	35	0	363	S	23/10/07	recidiva	M	14/07/08	Rec
712	F	41,5	LMA	Ap	6/6	AL	MO	18/02/09	26/02/09	23/03/09	3,41	3	21	28	712	CyA	0	100	2	194	S	07/04/11	recidiva	M	09/05/11	Rec
692	F	33,2	LLA	Ap	6/6	AL	CPP	21/10/08	03/11/08	26/11/08	5,78	4,01	22	20	692	CyA	0	100	2	339	N		RC	V		
639	M	38,0	LMA	Ap	6/6	AL	CPP	21/08/07	30/08/07	22/09/07	11,06	5,97	21	13	639	CyA	0	100	2	229	N		RC	V		

NP: número do paciente, M: masculino, F: feminino, LMA: leucemia mieloide aguda, SMD: síndrome mielodisplásica, LMC: leucemia mieloide crônica, LLA: leucemia linfóide aguda, Ap: aparentado, Transpl: tipo de transplante, AL: alogênico convencional, RIC: alogênico com condicionamento de intensidade reduzida, En: tipo de enxerto, MO: medula óssea, CPP: células progenitoras periféricas, Cl_s Nucl: número de células nucleadas x 10⁸, CD34+: número de células CD34+ x 10⁶

ProfDECH: profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro, CyA: ciclosporina, MMF: micofenolato mofetil, DECHa: grau da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (0 se não ocorreu), DiaDECHa: dia pós transplante da DECHa, DECHc: grau da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (0 se não ocorreu), DiaDECHc: dia pós transplante da DECHc, Rec: recidiva, S: sim, N: não, Data Rec: data da recidiva, StatusDi: situação da doença no último acompanhamento, RC: remissão completa, Sit: situação do paciente no último acompanhamento, V: vivo, M: morto, óbito: data do óbito, causa: causa do óbito, Infec: infecção, SPI: síndrome da pneumonia idiopática

9.3. Carta de aprovação do estudo no Comitê de Ética de Pesquisa (CEP)



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 20/01/10.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1156/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0891.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “QUANTIFICAÇÃO DO QUIMERISMO APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS USANDO AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DE ALELOS NULL E POLIMORFISMOS INSERÇÃO/DELEÇÃO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Danielly Côrtes Vicente

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 02/12/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 20/01/11 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a factibilidade e a reprodutibilidade desta técnica de quimerismo na população de pacientes submetidos a transplantes alogênico de medula óssea no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

III - SUMÁRIO

Serão analisados 30 pacientes, adultos e pediátricos, do Hemocentro/UNICAMP, submetidos a transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas devido a doenças malignas e não-malignas. Os critérios de inclusão/exclusão são claros e adequados bem como as metodologias a serem empregadas (coleta dos dados clínicos a partir do prontuário do paciente, coleta de sangue, análise do quimerismo por PCR convencional e de tempo real).

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

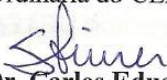
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de dezembro de 2009.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

9.4. Versão do artigo publicado na revista BMT

Bone Marrow Transplantation (2016), 1–2
© 2016 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0268-3369/16



www.nature.com/bmt

LETTER TO THE EDITOR

Chimerism interpretation with a highly sensitive quantitative PCR method: 6 months median latency before chimerism drop below 0.1%

Bone Marrow Transplantation advance online publication, 15 February 2016; doi:10.1038/bmt.2016.5

Despite better results with hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) over the years, high rates of relapse, which in acute leukemia can reach 30–70% of cases, remain a major challenge.^{1–2} The treatment of relapse has better outcomes if performed early. Studies show that the detection of mixed chimera after transplantation can predict for relapse in most cases and it may allow for earlier appropriate treatment, with higher chances of success.^{3–5}

A variety of techniques has been developed to determine post-transplant chimerism. The use of PCR-based amplification of STRs has become the gold standard for quantitative chimerism analysis but, although the high informativity and good accuracy of the method, its sensitivity is relatively low and the detection level of a minor genotype is between 0.4 and 5%.^{6–9} Some studies have proposed RQ-PCR-based methods that allow for the detection and quantification of hematopoietic chimerism, with sensitivities $\leq 0.1\%$ of the minor genotypes.¹⁰

In this study, we tested a method of quantitative PCR of insertions–deletions (indels) diallelic polymorphisms.^{11–13} RQ-PCRs were performed with TaqMan technology at an ABI Prism 7500 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The TaqMan reaction is based on the 5' nuclease activity of Taq DNA polymerase to cleave an oligonucleotide probe during PCR, thereby generating a detectable signal that is analyzed in a dedicated thermocycler.¹⁴ We analyzed samples from 41 adult patients submitted to HSCT at the Bone Marrow Unit of the University of Campinas between 2005 and 2010. Patients' DNA samples were appropriately stored and their concentrations were measured with Thermo Scientific Nanodrop 1000 (Wilmington, DE, USA). We first analyzed all pre-HSCT samples of patients and their respective donors for the presence of 13 indels polymorphisms. The primers and probes for the polymorphisms studied came in a set produced by the Spanish company Sistemas Genómicos (Valencia, Spain). The set also included the β globin gene for DNA quality control. We used a total of 25 ng of DNA and all samples were satisfactorily amplified. When a polymorphism was present in patient DNA and absent in donor DNA, it was considered informative and selected for further analysis. We found informative polymorphisms in 83% (34) of patients, half of them had more than one. Patients had at least three post-HSCT samples and were tested for one or two polymorphisms up to 1 year post HSCT, or longer, if relapse occurred later and samples were available. Two patients were excluded because of inadequate samples. The median number of samples was 7.5 per patient and we used 100 ng of DNA for the tests. A complete table with the characteristics of patients and the distribution of the polymorphisms studied can be found in the Supplementary Appendix.

Descriptive analyses were done and presented through graphics and tables. The time of relapse was defined as the date of first hematologic relapse. To investigate clinical correlations, Pearson correlation coefficient was applied and differences in quantitative variables were analyzed by Mann–Whitney or *t*-test,

when satisfactory, whereas categorical data were compared by χ^2 -test. Kaplan–Meier method and log-rank test were also applied for survival analysis. *P*-values below 0.05 were considered significant. SPSS (statistical package for social sciences) version 21.0 (Armonk, NY, USA) and the GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) were used.

Almost half (46.9%) of the patients relapsed, most of them (73.3%) in the first 6 months. The median overall survival for relapsed patients was 9 (2–98) months and, at the end of the observation period, only one patient (6.6%) was alive. The main cause of death was disease progression. Among non-relapsed patients, five (29.4%) died, four in 9 months post HSCT, mostly from infectious complications. Five-year overall survival in non-relapsed patients was significantly higher than in the relapsed group ($P=0.001$, log-rank test).

The quantitative PCR method was able to quantify the chimerism in almost all 249 post-HSCT samples and it was highly sensitive, with a minimum level of detection reaching 0.01%. For the analysis of post-HSCT samples, we used 100 ng of DNA. Only one patient had an inadequate amplification of the DNA in almost all his samples because of bad DNA quality. As shown in Figure 1, the chimerism kinetics was very different between groups of relapsed and non-relapsed patients. The relapsed group showed a steep initial drop and then a very early and fast rise in chimerism before hematologic relapse. The non-relapsed group showed, initially, a less deep and more progressive fall in the percentage of recipient cells, followed by a continuous and slow fall over time. Although we could not find a cutoff level of chimerism that could predict relapse, the difference in the kinetics was evident. Also, curiously, there was a median period of about 6 months before chimerism clearance reached levels below 0.1% in non-relapsed patients.

We tried to correlate the chimerism kinetics with the risk of relapse and the diagnosis, but we didn't find statistical significance. It is evident, though, that those patients who relapse have a very early rise in the population of recipient cells. As early as 6–8 weeks post transplantation, we started to see a difference in chimerism levels, but probably due to the limited sample size, there was no statistical significance, only a trend at 12–14 weeks ($P=0.06$). The median time to hematologic relapse was 18 weeks. This helps explain why there was no response to donor lymphocyte infusions among all five patients who were submitted to it after detection of mixed chimerism by variable number tandem repeat (VNTR)/STR and all of them died of disease progression. Early intervention upon evidence of relapse is crucial for prognosis in this population.

It was not possible to correlate the chimerism values with any other clinical parameter. The samples were heterogeneous at the time of collection and the number of patients was probably insufficient to be able to demonstrate a statistical difference between relapsed and non-relapsed patients based on the chimerism value. It is necessary to evaluate a larger number of patients in a prospective study.

The chimerism technique by real-time PCR of insertion–deletion diallelic polymorphisms was easy to perform and very accurate for

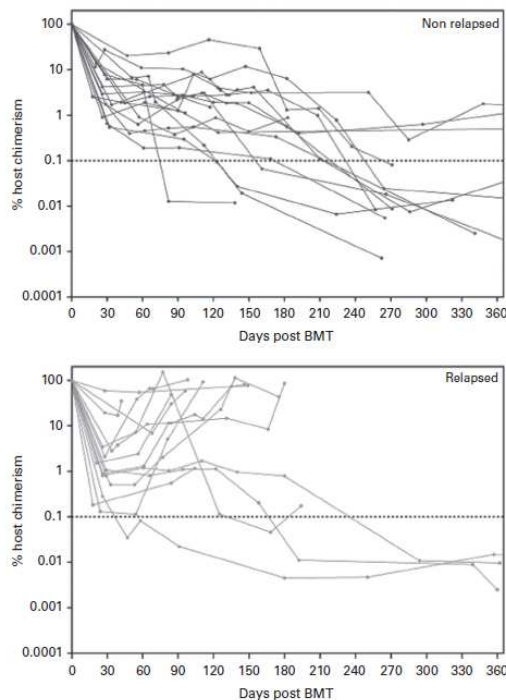


Figure 1. Differences in chimerism kinetics reveal a long time to clearance of host cells to $<0.1\%$ in non-relapsed patients, up to 1259 days post transplantation (median 189 days), and a very early rise in host cells in relapsed patients.

the detection of chimerism after HSCT. It was able to detect very low levels of recipient cells in the studied post-HSCT population. Although it was not able to determine a cutoff value that could be predictive of relapse, it showed that the chimerism kinetics is very different between relapsed and non-relapsed patients. There are still very few reports on the use of indels for longitudinal chimerism evaluation post HSCT and some important questions remain unanswered and need further investigation. Is it possible that the remaining recipient cells in the first 6 months post transplantation observed in the non-relapsed patients were responsible for triggering a more efficient GvL effect? Are these residual recipient cells normal or leukemic cells? Is initial mixed chimerism beneficial? The predominant type of recipient cells that remain after conditioning could be responsible for the results of the transplant. It is been reported, for example, that filters used in bone marrow harvest may contain on average 21% long-term culture-initiating cells and 15% fibroblast colony-forming units of the total progenitor cell content and that adding these cells to the harvest significantly reduced the incidence of grade II–IV GvHD and the transplant-related mortality.¹⁵ It highlights the importance of other bone marrow cells, such as mesenchymal cells in the mechanisms of engraftment. The evaluation of chimerism at such low levels could help us understand the complex mechanism of genetically distinct cells interacting in different post-transplantation settings. This could also lead to a better optimization of the current nonmyeloablative conditioning regimens for better GvL effect with lower adverse effects.

Supplementary Information accompanies this paper on Bone Marrow Transplantation website (<http://www.nature.com/bmt>)

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank São Paulo Research Foundation for funding this research and the Laboratory of Molecular Analysis of Polymorphism of the University of Campinas for providing the DNA samples.

DC Vicente¹, ABA Laranjeira², ECM Miranda¹, JA Yunes³
and CA de Souza¹

¹HEMOCENTRO, University of Campinas, Campinas, Brazil;

²Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância (CIPOI), University of Campinas, Campinas, Brazil and


³Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, University of Campinas, Campinas, Brazil
E-mail: danycvi@hotmail.com

REFERENCES

- Rivera GK, Pinkel D, Simone JV, Hancock ML, Crist WM. Treatment of acute lymphoblastic leukemia: 30 years' experience at St Jude Children's Research Hospital. *New Engl J Med* 1993; **329**: 1289–1295.
- Kiehl MG, Kraut L, Schwerdtfeger R, Hertenstein B, Remberger M, Nicolaus K *et al.* Outcome of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in adult patients with acute lymphoblastic leukemia: no difference in related compared with unrelated transplant in first complete remission. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 2816–2825.
- Formánková R, Sedláček P, Krsková L, Rihová H, Srámková L, Star J *et al.* Chimerism-directed adoptive immunotherapy in the prevention and treatment of post-transplant relapse of leukemia in childhood. *Haematologica* 2003; **88**: 117–118.
- Dey BR, McAfee S, Colby C, Sackstein R, Saidman S, Tarbell N *et al.* Impact of prophylactic donor leukocyte infusions on mixed chimerism, graft-versus-host disease, and antitumor response in patients with advanced hematologic malignancies treated with nonmyeloablative conditioning and allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; **9**: 320–329.
- Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P *et al.* Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol* 2004; **22**: 1696–1706.
- Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R *et al.* 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* 1998; **21**: 487–495.
- Casarino L, Carbone C, Capucci MA, Izzi T, Ferrara GB. Analysis of chimerism after bone marrow transplantation using specific oligonucleotide probes. *Bone Marrow Transplant* 1992; **10**: 165–170.
- Oliver DH, Thompson RE, Griffin CA, Eshleman JR. Use of single nucleotide polymorphisms (SNP) and real-time polymerase chain reaction for bone marrow engraftment analysis. *J Mol Diagn* 2000; **2**: 202–208.
- Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C *et al.* Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002; **99**: 4618–4625.
- Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buño I, Dolstra H *et al.* Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2003; **17**: 621–629.
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: 854–862.
- Wilhelm J, Reuter H, Tews B, Pingoud A, Hahn M. Detection and quantification of insertion/deletion variations by allele-specific real-time PCR: application for genotyping and chimerism analysis. *Biol Chem* 2002; **383**: 1423–1433.
- Jiménez-Velasco A, Barríos M, Román-Gómez J, Navarro G, Buño I, Castillejo JA *et al.* Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia* 2005; **19**: 336–343.
- Heid CA, Stevens J, Livak KL, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; **6**: 986–994.
- Vicente D, Podestà M, Pitto A, Pozzi S, Lucchetti S, Lamparelli T *et al.* Progenitor cells trapped in marrow filters can reduce GvHD and transplant mortality. *Bone Marrow Transplant* 2006; **38**: 111–117.

9.5. License to publish – autorização para o autor utilizar o artigo em teses

LICENCE TO PUBLISH

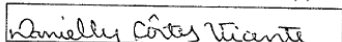
nature publishing group 

Manuscript Number: BMT-2015-721RR	Journal Name: BONE MARROW TRANSPLANTATION	(the "Journal")
Proposed Title of the Contribution: CHIMERISM INTERPRETATION WITH A HIGHLY SENSITIVE QUANTITATIVE PCR METHOD: SIX MONTHS MEDIAN LATENCY BEFORE CHIMERISM DROP BELOW 0.1%.		(the "Contribution")
Author(s): DANIELLY CORTES VICENTE, ANGELO BRUNELLI ALBERTONI LARANJEIRA, ELIANA CRISTINA MARTINS MIRANDA, JOSE ANDRES YUNES, ARMINO ANTONIO DE SOUZA		(the "Author(s)")

To: Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Ltd ("NPG")

- In consideration of NPG evaluating the Contribution for publication (and publishing the Contribution if NPG so decides) the Author(s) grant to NPG for the full term of copyright and any extensions thereto, subject to clause 2 below, the exclusive right and irrevocable licence:
 - to edit, adapt, publish, reproduce, distribute, display and store the Contribution in all forms, formats and media whether now known or hereafter developed (including without limitation in print, digital and electronic form) throughout the world;
 - to translate the Contribution into other languages, create adaptations, summaries or extracts of the Contribution or other derivative works based on the Contribution and exercise all of the rights set forth in (a) above in such translations, adaptations, summaries, extracts and derivative works;
 - to licence others to do any or all of the above; and
 - to re-licence article metadata without restriction (including but not limited to author name, title, abstract, citation, references, keywords and any additional information, as determined by NPG).
- Ownership of copyright remains with the Author(s), and provided that, when reproducing the Contribution or extracts from it or the Supplementary Information (defined below), the Author(s) acknowledge first and reference publication in the Journal, the Author(s) retain only the following non-exclusive rights:
 - to reproduce the Contribution in whole or in part in any printed volume (book or thesis) of which they are the Author(s);
 - they and any academic institution where they work may reproduce the Contribution for the purpose of course teaching;
 - to post a copy of the Contribution as accepted for publication after peer review (in a locked word processing file, or a PDF version thereof) on the Author(s)' own web sites, or institutional repositories, or the Author(s)' funding body(s)' archive, six months after publication of the printed or online edition of the Journal, provided that they also link to the Contribution on NPG's web site; and
 - to reuse figures or tables created by the Author(s) and contained in the Contribution in oral presentations and other works created by them.
- The Author(s) grant to NPG for the full term of copyright and any extensions thereto the same rights that have been granted in respect of the Contribution as set out in clause 1 above, in and to all supplementary material in any form (including without limitation images, videos, tables and/or graphs) submitted by the Author(s) to NPG with or in connection with the Contribution ("Supplementary Information") but on a non-exclusive basis.
- NPG acknowledges that an earlier version of the Contribution and/or Supplementary Information may have been submitted to a pre-print service (in accordance with that service's standard licence terms).
- The Author(s) warrant and represent that:
 - the Author(s) are the sole Author(s) of and sole owners of the copyright in the Contribution and the Supplementary Information and the Contribution and the Supplementary Information is the original work of the Author(s) and not copied (in whole or part) from another work. If however the Contribution or the Supplementary Information includes materials from other sources, the Author(s) warrant they have obtained the necessary rights from the owners of the copyright in all such materials and hereby license to NPG the rights to use such materials in accordance with the grant of rights in clause 1. Copies of all such grant of rights from third parties are attached to this licence;
 - all of the facts contained in the Contribution and the Supplementary Information are true and accurate;
 - the signatory (the Author or the employer) who has signed this Agreement below has full right, power and authority to enter into this Agreement and grant the rights herein on behalf of all of the Authors;
 - nothing in the Contribution or the Supplementary Information is obscene, defamatory, libellous, violates any right of privacy or publicity, infringes any intellectual property rights (including without limitation copyright, patent, database or trademark rights) or any other human, personal or other rights of any person or entity or is otherwise unlawful; and
 - nothing in the Contribution or the Supplementary Information infringes any duty of confidentiality which any of the Author(s) may owe to anyone else or violates any contract, express or implied, of any of the Author(s), and all of the institutions in which work recorded in the Contribution or the Supplementary Information was created or carried out, have authorised such publication.
- The Author(s) authorise NPG to take such steps as it considers necessary at its own expense in the Author(s) name and on their behalf if NPG believes that a third party is infringing or is likely to infringe copyright in the Contribution and/or Supplementary Information including but not limited to initiating legal proceedings.
- The Author(s) grant NPG the perpetual right to edit, correct, or retract the Contribution and Supplementary Information if NPG considers (in its reasonable opinion) that such actions are required. The Author(s) hereby agree that they shall not object to NPG carrying out any such actions.
- The Author(s) shall cooperate fully with NPG in relation to any legal action that might arise from the publication of the Contribution and/or Supplementary Information and the Author(s) shall give NPG access at reasonable times to any relevant accounts, documents and records within the power or control of the Author(s).
- If the Contribution is rejected by NPG and not published, all rights under this licence shall revert to the Author(s).
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of England and Wales. The parties irrevocably agree that the courts of England and Wales shall have exclusive jurisdiction to settle any dispute or claim that arises out of or in connection with this Agreement or its subject matter or formation.

Signed for and on behalf of the Author(s):


(PLEASE NOTE, ONLY HAND WRITTEN SIGNATURES ARE ACCEPTED)

Print name:

DANIELLY CORTES VICENTE

Date:

01-04-2016

Address:

AV. RECANTO DAS ARAUCARIAS, SIN CASA 78
SOUSAS - CAMPINAS SP BRAZIL CEP 13105-801

Does the Contribution and/or the Supplementary Information contain material from third parties (including previously published images/figures)?

Yes No (if yes, please ensure copies of the grant of rights are submitted with this form as indicated in clause 5(a))