

Revisão / Review

## Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real

### *Monitoring minimal residual disease in chronic myeloid leukemia by real time PCR*

Priscilla S. R. Almeida<sup>1</sup>Vera Aparecida Saddi<sup>2</sup>

O monitoramento de doença residual mínima (DRM) em leucemia mielóide crônica é extremamente importante, pois possibilita o diagnóstico precoce de eventuais recidivas da doença. Este estudo visa apresentar uma revisão bibliográfica sobre a aplicação e a avaliação da eficácia do método de PCR em tempo real no monitoramento da doença residual mínima em pacientes com leucemia mielóide crônica. O método fornece informações a respeito do número e cinética das células tumorais residuais, sendo atualmente o padrão ouro para seu monitoramento. O uso de transcrição reversa associada à PCR em tempo real tornou a quantificação de mRNA mais simples e precisa. A metodologia mais utilizada é a TaqMan, que emprega a atividade exonucleásica 5'-3' da Taq DNA Polimerase. O monitoramento da DRM é feito após transplante de medula óssea ou após terapias baseadas em drogas, como o interferon- $\alpha$  e o mesilato de imatinibe. Entretanto, os estudos sobre o assunto apresentam os dados de maneiras conflitantes, dificultando a interpretação e comparação dos resultados. A determinação e uniformização dos cut-offs em diversas condições se fazem necessárias a fim de que a metodologia de PCR em tempo real seja aplicada na clínica. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(4):382-386.

**Palavras-chave:** PCR em tempo real; leucemia mielóide crônica; doença residual mínima.

### Introdução

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma proliferação exacerbada das células do sistema hematopoiético, caracterizada pela expansão clonal de uma célula-tronco primitiva e pluripotente.<sup>1</sup> A LMC é mais comum em indivíduos com idades avançadas, sendo a idade média dos pacientes afetados em torno de 60 anos.<sup>2</sup> A LMC foi a primeira leucemia associada a um rearranjo cromossômico específico, o cromossomo Philadelphia (Ph).<sup>3</sup> O Ph é resultante da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, transpondo o segmento 3' do gene ABL para o segmento 5' do gene BCR. O gene BCR, presente no cromossomo 22, não possui função conhecida, enquanto o gene ABL, presente no cromossomo 9, é um protooncogene. O gene resultante,

BCR-ABL, é transcrito em um RNA-mensageiro (mRNA) quimérico e então traduzido em proteínas de tamanhos variados (p190<sup>bcr-abl</sup>, p210<sup>bcr-abl</sup>, p230<sup>bcr-abl</sup>), dependendo da localização dos pontos de quebra dos genes envolvidos.<sup>4</sup> Essas proteínas quiméricas têm localização citoplasmática e atividade aumentada de tirosina-quinase,<sup>2</sup> correlacionada com diferentes resultados clínicos.

Algumas mutações gênicas acarretam anormalidades no ciclo celular por si próprias, enquanto outras requerem múltiplos eventos genéticos ou epigenéticos para gerar um fenótipo neoplásico.<sup>4</sup> Na LMC, os eventos epigenéticos ou secundários à translocação BCR/ABL parecem ser necessários para uma leucemogênese completa. Pacientes com LMC, depois de tratados, podem expressar transcritos BCR-ABL e continuar em remissão clínica por muitos anos.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Especialista em Genética e aluna do Programa de Mestrado em Genética, Departamento de Biologia da Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>2</sup>Profa. dos Departamentos de Biologia, Biomedicina, Medicina e do Núcleo de Pesquisas Replicon, Universidade Católica de Goiás e pesquisadora do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

**Correspondência:** Vera Aparecida Saddi

Departamento de Biologia – Núcleo de Pesquisas Replicon – Universidade Católica de Goiás – Área IV – Bloco L

Av. Universitária s/n – Setor Universitário

74065-010 – Goiânia-GO – Brasil

E-mail: vsaddi@terra.com.br

A LMC é tratada com quimioterapia, terapias baseadas em interferon e transplante hematopoiético. O desenvolvimento recente do mesilato de imatinibe, um inibidor seletivo da atividade de tirosina-quinase da proteína bcr-abl, está mudando o padrão de tratamento e cura da LMC.<sup>2</sup> A resposta do paciente ao tratamento é avaliada sob três aspectos: (1) resposta hematológica, definida pela normalização de valores no sangue periférico e avaliação do tamanho do baço; (2) resposta citogenética, definida pela proporção de metáfases Ph-positivas residuais; e (3) resposta molecular, definida por meio da avaliação da transcrição gênica (mRNA) ou da detecção de proteínas bcr-abl residuais.<sup>5</sup>

Após o tratamento, a presença de células leucêmicas residuais sem evidência clínica de doença é definida como doença residual mínima (DRM).<sup>2</sup> Nesse quadro, os níveis de leucemia estão abaixo da detecção pela microscopia convencional. A detecção da DRM em pacientes com LMC tem o objetivo de determinar a resposta ao tratamento, possibilitando o diagnóstico precoce de eventuais recidivas.<sup>5</sup> Portanto, as estratégias de monitoramento da DRM devem ser capazes de detectar a resposta ao tratamento com maior rapidez e precisão mesmo que o nível da doença esteja muito baixo.<sup>2</sup>

Na avaliação da doença residual mínima, o monitoramento periódico da resposta do paciente à terapia tornou-se um componente essencial, permitindo possíveis modificações na dosagem de drogas, inclusão de outros agentes quimioterápicos ou mudança para outras modalidades terapêuticas, incluindo o transplante alogênico de medula óssea.<sup>6</sup> Métodos capazes de detectar células tumorais residuais ou recidivas precoces sem manifestações clínicas têm sido amplamente implementados, na tentativa de instituir a terapêutica adequada o mais rápido possível.<sup>7</sup> O exame morfológico de sangue periférico e medula óssea, juntamente com a citogenética convencional, têm sido satisfatórios no diagnóstico da LMC.<sup>8</sup> Nos últimos anos, foram desenvolvidas muitas metodologias capazes de detectar a t(9;22) e seus respectivos transcritos, incluindo a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), *Southern blotting*, citometria de fluxo, RT-PCR e PCR em tempo real.

Este estudo visa apresentar uma revisão bibliográfica sobre a aplicação e a avaliação da eficácia do método de PCR em tempo real no monitoramento da doença residual mínima em pacientes com leucemia mielóide crônica. Utilizando as palavras-chave: *Real Time PCR*, *chronic myeloid leukemia*, *minimal residual disease* no banco de dados Medline, foram selecionados 24 artigos científicos relacionados aos termos.

#### *O método de PCR em tempo real*

A PCR em tempo real (RQ-PCR) é uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR.<sup>9</sup> Durante a RQ-PCR, o acúmulo de *amplicons* é detectado em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas sequência-específicas ou *primers*

usados na reação.<sup>8</sup> O uso de transcrição reversa associada a PCR em tempo real tornou a quantificação de mRNA mais simples e precisa.<sup>10</sup> A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação.<sup>11</sup> Várias tecnologias de PCR em tempo real estão disponíveis no mercado. Os dois sistemas mais usados são o SYBR Green e o TaqMan.<sup>12</sup> O SYBR Green é um corante que se liga ao sulco menor da fita dupla de DNA, tornando-o fluorescente. As vantagens de sua utilização incluem o fácil manuseio e o baixo custo. Durante os ciclos consecutivos de PCR, a quantidade de DNA de fita dupla se eleva de maneira exponencial, aumentando assim a quantidade de SYBR Green ligado e sua fluorescência. Entretanto, quando ocorre amplificação inespecífica ou amplificação de dímeros de *primers*, estes também são detectados, interferindo com a quantificação final dos produtos específicos da reação. Para avaliar se produtos de PCR inespecíficos foram formados na reação, uma curva de fusão é construída. Se apenas os produtos específicos de PCR foram amplificados, um único pico será visualizado no gráfico de fusão.<sup>13</sup> A metodologia TaqMan (Perkin Elmer Applied Biosystems) utiliza a atividade exonucleásica 5'-3' da Taq@ DNA Polimerase<sup>13,14,15</sup> e tem sido amplamente utilizada. Essa enzima digere uma sonda marcada que anela especificamente na parte interna do seguimento a ser amplificado entre dois *primers*. A sonda TaqMan possui na extremidade 5' uma molécula fluorescente cuja função é denominada "*reporter*" e na extremidade 3', outra molécula que pode ou não ser fluorescente (de comprimento de onda diferente), cuja função é chamada de "*quencher*". Enquanto a sonda está íntegra, o "*quencher*" oculta o sinal fluorescente do "*reporter*". Esse efeito desaparece quando a sonda, anelada entre os *primers*, é clivada pela atividade exonucleásica da enzima Taq@ DNA Polimerase. Enquanto a reação de PCR se processa, a polimerase sintetiza novas cadeias a partir dos *primers* e cliva a sonda correspondente, resultando em aumento do sinal fluorescente que é captado a cada ciclo até atingir um limiar (*threshold*), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência. É um ponto definido pelo pesquisador e obrigatoriamente deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência de base (*background*). O limiar é definido na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde (mRNA/cDNA) amplificadas pela reação.

#### *Aplicações da PCR em tempo real na avaliação da DRM em pacientes com LMC*

A PCR em tempo real apresenta diversas aplicações, incluindo estudos da expressão de mRNA, medida do núme-

ro de cópias de DNAs genômicos ou virais e de transgenes e ensaios de discriminação alélica. A quantificação de produtos de translocação gênica e a análise dos níveis de expressão do mRNA em leucemias representam aplicações de relevância em hematologia.<sup>9</sup> Os resultados da PCR em tempo real são expressos na forma de razão entre a amplificação de um gene de interesse e um controle endógeno.<sup>12</sup> Frequentemente, na monitoração da DRM os genes ABL ou G6PD (glicose 6-fosfato-desidrogenase) são preferencialmente usados como controles endógenos na quantificação do BCR-ABL. Os resultados são expressos na forma de razões BCR-ABL/ABL ou BCR-ABL/G6PD.<sup>5</sup> A expressão dos resultados em razões BCR-ABL/ABL elimina a interferência de variáveis na qualidade do RNA, na sua quantificação e na eficiência da transcrição reversa.<sup>16</sup> Sondas complementares às seqüências do éxon 2 do ABL e *primers* que flanqueiam a região específica da translocação BCR-ABL têm sido usados na detecção dos dois transcritos mais comuns.<sup>17</sup>

A PCR quantitativa em tempo real traduz de forma legítima os níveis da doença residual mínima,<sup>8</sup> sendo atualmente o "padrão ouro" para seu monitoramento. O método fornece informações a respeito do número e cinética das células tumorais residuais.<sup>7</sup> Após o transplante de medula óssea, a PCR em tempo real deve ser realizada a cada 4 semanas, enquanto os transcritos BCR-ABL continuarem a ser detectados. Quando os níveis de transcritos tornam-se indetectáveis, os intervalos podem ser prolongados para 3-6 meses. Caso ocorra aumento dos níveis de transcritos, os testes de PCR em tempo real devem ser realizados com maior frequência.<sup>8</sup>

#### *Sensibilidade da PCR em tempo real na avaliação da DRM em pacientes com LMC*

A sensibilidade da PCR em tempo real depende da integridade do mRNA utilizado na análise<sup>18</sup> e é determinada por meio de experimentos de diluição feitos com a amostra do próprio paciente ou um padrão de referência, ou seja, uma linhagem celular ou plasmídeos contendo a seqüência gênica de interesse.<sup>13</sup> Fatores que interferem com a integridade do mRNA, como atraso na extração e no transporte de amostras, podem interferir também com os resultados da PCR em tempo real. Estudos demonstram<sup>18,19</sup> que o transporte da amostra à temperatura ambiente com uma demora de mais de 48 horas em seu processamento causa uma perda de RNA intacto e um decréscimo significativo na sensibilidade do método. A extração do RNA pode ser feita por meio de métodos domésticos (guanidino-fenol-clorofórmio, gradiente de ultracentrifugação com CsCl) 10 ou kits comerciais (Trizol, PAXgene Blood RNA kit e RNeasy Mini kit), utilizando-se sangue periférico com EDTA. Pelo menos 10 ml de sangue periférico são necessários para a análise.<sup>19</sup> Uma vez que os pontos de quebra envolvidos na translocação BCR-ABL variam de um paciente para outro, vários tipos de transcritos são possíveis, tornando essencial o uso de múltiplos *primers* em uma única reação.<sup>12</sup>

A discussão a respeito do uso da PCR na tomada de decisões terapêuticas e na detecção de DRM em pacientes com LMC iniciou-se com Faderl *et al.*, 1999, que destacaram a necessidade de se estabelecer um limiar de transcritos BCR-ABL capaz de identificar a presença/ausência de DRM como marcador prognóstico.<sup>3</sup> A tabela 1 mostra os principais estudos que utilizaram RQ-PCR para o monitoramento de DRM.

Tabela 1. Estudos utilizando PCR em tempo real na detecção de transcritos BCR-ABL. Dados relativos à sensibilidade do método e à razão média entre os transcritos BCR-ABL/ABL são apresentados

Estudo	N (amostras)	Sensibilidade	Razão BCR-ABL/ABL (média)
Emig <i>et al.</i> , 1999	254	1:10 <sup>5</sup>	4,6
Kreuzer <i>et al.</i> , 1999	10	ND	ND
Barbany <i>et al.</i> , 2000	13	1:10 <sup>5</sup>	ND
Bolufer <i>et al.</i> , 2000	52	1: 5x10 <sup>4</sup>	0,1
Saffroy <i>et al.</i> , 2000	186	1: 10 <sup>4</sup>	ND
Amabile <i>et al.</i> , 2001	59	1: 10 <sup>6</sup>	15,334 (ao diagnóstico) 0,9 (em remissão clínica) 0,7 (em remissão citogenética)
Müller <i>et al.</i> , 2002	26	ND	ND
Kim <i>et al.</i> , 2004	23	ND	ND

Emig *et al.* compararam as técnicas de citogenética, *Southern blot*, PCR qualitativa e PCR competitiva com a técnica quantitativa de PCR em tempo real, analisando 254 amostras (222 de sangue periférico e 32 de medula óssea) obtidas de 120 pacientes (76 homens e 44 mulheres). Das 254 amostras positivas para a detecção de BCR-ABL, por meio de PCR qualitativa, 245 também foram positivas por meio da metodologia quantitativa. A quantidade de transcritos detectados variou entre 10 e 3.700.000. Os autores concluíram que havia uma boa correlação entre as razões BCR-ABL/ABL encontradas pela técnica de PCR em tempo real com as demais metodologias analisadas.<sup>20</sup>

Kreuzer *et al.* compararam o número de cópias de transcritos BCR-ABL obtidas de dez amostras positivas, utilizando dois diferentes sistemas TaqMan de PCR em tempo real (LightCycler e ABI PRISM 7700 SDS). Uma boa correlação entre estes dois sistemas foi detectada, demonstrando que ambos podem ser usados na quantificação de transcritos BCR-ABL.<sup>21</sup>

Barbany *et al.*, utilizando um sistema de suporte revestido com oligo(dT)s para o isolamento direto de mRNA a partir de lisados celulares, analisaram amostras de sangue periférico de 13 pacientes com LMC, quanto à expressão de BCR-ABL por meio de PCR em tempo real. Os resultados foram comparados com os dados de citogenética analisados

em amostras de medula óssea. Uma boa correlação da expressão de BCR-ABL com os dados clínicos e citogenéticos foi demonstrada no estudo.<sup>10</sup>

Bolufer *et al.* quantificaram transcritos BCR-ABL em 52 amostras de pacientes com LMC, incluindo 45 amostras de sangue periférico, cinco de medula óssea e dois produtos de aférese, antes e após transplante de medula óssea. Verificou-se um decréscimo significativo no número absoluto de transcritos BCR-ABL e na razão BCR-ABL/ABL após o transplante, mas o desaparecimento desses transcritos não foi uniforme.<sup>22</sup>

Saffroy *et al.* utilizaram PCR em tempo real, RT-PCR (transcrição reversa) e citogenética na detecção de translocações BCR-ABL e seus produtos de transcrição em 76 pacientes com leucemia e outras desordens mielodisplásicas. Amostras de sangue periférico e medula óssea foram estudadas. Quando os resultados de RQ-PCR e RT-PCR foram comparados, verificou-se uma concordância entre 96% das amostras e quando os resultados de citogenética e RQ-PCR foram comparados, verificou-se uma concordância entre 90% das amostras. Uma boa concordância entre os resultados de sangue periférico e medula óssea também foi demonstrada, sugerindo ser possível o acompanhamento da doença apenas com a análise de amostras regulares de sangue. O estudo demonstra que a razão BCR-ABL/ABL correlaciona-se bem com os aspectos clínicos do paciente, confirmando a aplicação da RQ-PCR na detecção precoce de recidivas.<sup>16</sup>

Amabile *et al.*, realizaram testes de citogenética, RT-PCR qualitativa, RT-PCR competitiva seguida de eletroforese capilar e PCR em tempo real em 59 amostras de medula óssea obtidas de 48 pacientes com LMC. Os resultados concluíram que a RQ-PCR é significativamente mais sensível do que a RT-PCR qualitativa e que o aumento dos níveis de transcritos BCR-ABL pode ser detectado antes de uma recidiva citogenética ou hematológica.<sup>17</sup>

A padronização de fatores pré-analíticos, como a qualidade e a concentração de RNA intacto, foi discutida por Muller *et al.*<sup>18</sup> Neste estudo, foram selecionados 26 pacientes com LMC, BCR-ABL-positivos, tratados com imatinibe. Os métodos de extração de RNA comerciais foram comparados às metodologias domésticas. Diante dos resultados obtidos, os autores propuseram o uso de metodologias comerciais para a estabilização do RNA. A padronização do volume de sangue coletado, do tempo de transporte da amostra até o laboratório e da temperatura durante o transporte também foi estabelecida.<sup>18</sup>

Kim *et al.*<sup>23</sup> monitoraram a razão BCR-ABL após terapia com imatinibe em pacientes com LMC recidivados após transplante. Este estudo demonstrou que os níveis de transcritos BCR-ABL em pacientes que chegaram à remissão molecular diminuem significativamente dentro dos seis primeiros meses de terapia com imatinibe. Portanto, o monitoramento precoce de transcritos pela RQ-PCR pode indicar uma remissão molecular subsequente.<sup>23</sup>

## Discussão

Avaliar a proporção de células malignas em pacientes com LMC após terapia é fundamental para o acompanhamento do paciente.<sup>20</sup> A quantificação dos transcritos BCR-ABL permite uma visualização mais adequada da evolução e eficácia do tratamento. A comparação da razão BCR-ABL/ABL em diferentes fases da doença permite monitorar flutuações significativas compatíveis com o desencadeamento de uma possível recidiva. A PCR em tempo real demonstra ser a metodologia de escolha para esta finalidade, uma vez que fornece resultados quantitativos de maneira legítima e permite avaliar a evolução cinética dos transcritos BCR-ABL durante o curso da doença. A técnica apresenta uma alta taxa de reprodutibilidade<sup>24</sup> e tal característica se deve ao fato de que a amplificação e a análise dos produtos são realizadas no mesmo tubo, evitando contaminações ou pipetagens imprecisas.<sup>5</sup> A tecnologia TaqMan se sobressai entre as demais por ser mais rápida e precisa, sendo mais adequada a esse propósito. Entretanto, os estudos aqui revisados apresentaram os dados de maneira conflitante, dificultando a interpretação e comparação dos resultados obtidos. Até o momento, as diferenças apresentadas na determinação da razão BCR-ABL/ABL, antes, durante e após tratamento são estatisticamente significativas, mas os *cut-offs* para as diferentes etapas não foram ainda muito bem definidos. A determinação e uniformização dos *cut-offs* em diversas condições se fazem necessárias a fim de que a metodologia de PCR em tempo real seja aplicada na clínica. O estabelecimento de um protocolo padrão para a técnica de PCR em tempo real possui a vantagem de diminuir as variáveis que causam diferenças interlaboratoriais, mas, por outro lado, tem a desvantagem de não oferecer a flexibilidade necessária para o aperfeiçoamento do ensaio em laboratórios individuais. A utilização de um protocolo padronizado parece mais viável, vez que a uniformização interlaboratorial das técnicas e dos resultados facilita o intercâmbio de informações entre os grandes centros, possibilitando o uso da metodologia de PCR em tempo real na rotina clínica.

## Conclusão

Rotineiramente, a citogenética é recomendada para a detecção da translocação clássica t(9;22)(q34;q11) e anormalidades adicionais que possam aparecer na evolução da LMC para fases avançadas. Entretanto, a análise apresentada em nosso estudo permite concluir que a PCR em tempo real é a técnica mais rápida, sensível e eficaz no monitoramento de doença residual mínima em pacientes com LMC. A RQ-PCR oferece a vantagem de ser facilmente padronizada e, em breve, deverá ser utilizada na rotina clínica, não apenas no tratamento da LMC, mas, também, nas demais leucemias que apresentam marcadores moleculares reconhecidos.

**Abstract**

Monitoring minimal residual disease (MRD) in chronic myeloid leukemia is a very important issue, because it makes early diagnosis of relapse of the disease possible. The objective of this study is to present a review on the use and evaluation of real time PCR in monitoring minimal residual disease in patients with chronic myeloid leukemia. The method provides information on the number and kinetics of tumour residual cells which currently it is the gold standard for monitoring MRD. The use of reverse transcription associated to real time PCR has made the quantification of mRNA easier and more accurate. TaqMan methodology, that exploits the 5'-3' exonuclease activity of Taq DNA Polymerase, is the most common method used for this purpose. Monitoring MRD is required after stem cell transplantation and after drug-based therapies including Interferon- $\alpha$  and Imatinib Mesylate. So far, the studies published on this issue present differing and conflicting data, making the interpretation and comparison of the results very difficult. In order to use real time PCR to monitor MRD in chronic myeloid leukemia patients it is necessary to determine and to standardize cut-off points for results obtained under different conditions. This procedure will certainly be helpful for better clinical decision making. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007;29(4):382-386.

**Key words:** Real Time PCR; chronic myeloid leukemia; minimal residual disease.

**Referências Bibliográficas**

- Barboza LP, Souza JM, Simões FV, Bragança IC, Abdelhay E. Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em Leucemia Mielóide Crônica. *Rev. Bras. Hematol.* 2000;22(2):89-98.
- Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC Jr, Gansler TS, Holland JF, Frei III, Emil (editors) Hamilton. *Cancer Medicine*. 6<sup>o</sup> ed. Canadá: BC Decker Inc; 2003.
- Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.
- Faderl S, Talpaz M, Kantarjian HM, Estrov Z. Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making? *Blood*. 1999;93(9):2755-59.
- Hochhaus A, Weisser A, Rosée PL, Emig M, Müller MC, Saubele S, et al. Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2000;14:998-1005.
- Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, Faderl S, et al. Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses. *Blood*. 2003;101(1):97-100.
- Simões BP. Avaliação de doença residual mínima pós-transplante de medula óssea. *Medicina*. 2000;33:433-42.
- Faderl S, Hochhaus A, Hughes MD. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 2004;18:657-70.
- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*. 2002;30:503-12.
- Barbany G, Hagberg A, Olson-Strömberg U, Simonsson B, Syvänen AC, Landegren U. Manifold-assisted reverse transcription-PCR with real-time detection for measurement of the BCR-ABL fusion transcript in chronic myeloid leukemia. *Clinical Chemistry*. 2000; 46(7):913-20.
- Novais CM, Pires-Alves M. PCR em Tempo Real. *Rev. Biotecnol. Ciên. Desenv.* 2004;33.
- Kaeda J, Chase A, Goldman JM. Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematologica*. 2002;107:64-75.
- van der Velden VHJ, Hochhaus A, Gazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJM. *Leukemia*. 2003;17:1013-34.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DD. Detection of specific polymerase chain reaction by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(16):7276-80.
- Lee SK. The 3'-5' exonuclease of human DNA polymerase  $\delta$  (pol  $\delta$ ) is regulated by pol  $\delta$  accessory factors and deoxyribonucleoside triphosphates. *Nucl Ac Res*. 1993;21(8):1935-9.
- Saffroy R, Lemoine A, Brézillon P, Frénoy N, Delmas B, Goldschmidt E, et al. Real-time quantitation of bcr-abl transcripts in haematological malignancies. *Eur J Haematol*. 2000;65:258-66.
- Amabile M, Giannini B, Testoni N, Montefusco V, Rosti G, Zardini C, et al. Real-time quantification of different types of bcr-abl transcript in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2001; 86:252-9.
- Müller MC, Merx K, Weißer A, Kreil S, Lahaye T, Hehlmann R, et al. Improvement of molecular monitoring of residual disease in leukemias by bedside RNA stabilization. *Leukemia*. 2002; 16:2395-9.
- Müller MC, Hördt T, Paschka P, Merx K, La Roseé P, Hehlmann R, et al. Standardization of peranalytical factors for minimal residual disease analysis in chronic myelogenous leukemia. *Acta Haematologica*. 2004;112:30-3.
- Emig M, Saubele S, Wittor H, Weiber A, Reiter A, Willer A, et al. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia*. 1999;13:1825-32.
- Kreuzer KA, Lass U, Bohn A, Landt O, Schmidt A. LightCycler Technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Research*. 1999;59:3171-4.
- Bolufer P, Sanz GF, Barragán E, Sanz MA, Cervera J, Lerma E, et al. Rapid quantitative detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients by real-time reverse transcriptase polymerase-chain reaction using fluorescently labeled probes. *Haematologica*. 2000;85:1248-54.
- Kim YJ, Kim DW, Lee S, Min CK, Gob HG, Kim SH, et al. Early prediction of molecular remission by monitoring BCR-ABL transcript levels in patients achieving a complete cytogenetic response after imatinib therapy for posttransplantation chronic myelogenous leukemia relapse. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2004;10:718-25.
- Elmaagacli AH. Real-time PCR for monitoring minimal disease in patients after allogeneic transplantation. *Int Jour Hematology Supplement II*. 2002;76(2):204-5.

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

Recebido: 02/08/2006  
Aceito após modificações: 10/04/2007