



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA
E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA**



**ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA E SUA RELAÇÃO COM
CRITÉRIOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO DE LEUCEMIA LINFÓIDE
AGUDA NA INFÂNCIA**

THAIS DITOLVO DA COSTA SALINA

MANAUS

2015

THAIS DITOLVO DA COSTA SALINA

**ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA E SUA RELAÇÃO COM
CRITÉRIOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO DE LEUCEMIA LINFÓIDE
AGUDA NA INFÂNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências aplicadas à Hematologia*

Orientadora: **Dr^a Leny Nascimento da Motta Passos**
Co-Orientadora: **Dr^a Cristina Motta Ferreira**

**MANAUS
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

APRESENTAÇÃO:

Salina, Thais Ditolvo da Costa

Estudo da doença residual mínima e sua relação com critérios de estratificação de risco de leucemia linfóide aguda na infância. Thais Ditolvo da Costa Salina. - Manaus, 2015.

x, 93f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas.

Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia.

Título em inglês: Study of minimal residual disease and its relationship with acute lymphoblastic leukemia risk stratification criteria in childhood.

1.Leucemia linfóide aguda/Infância

3. Estratificação de risco/Leucemia linfóide aguda

2.Leucemia linfóide aguda/ Doença residual mínima/Infância

FOLHA DE JULGAMENTO**ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA E SUA RELAÇÃO COM
CRITÉRIOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO DE LEUCEMIA LINFÓIDE
AGUDA NA INFÂNCIA****THAIS DITOLVO DA COSTA SALINA**

“Esta Dissertação foi julgada adequada pela Banca de Defesa do Programa de Pós-Graduação em Ciências aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”.

Banca Julgadora:

**Prof^a. Leny Nascimento da Motta Passos, Dr^a.
Presidente**

**Prof. Nelson Abraham Fraiji, Dr.
Membro**

**Prof. Erich Vinícius de Paula, Dr.
Membro**

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo que me deu a permissão de cumprir a honrosa missão de trabalhar em benefício das crianças e adolescentes com câncer.

Aos meus pais Ilidio Alves da Costa e Lilian Ditolvo Alves da Costa pelo exemplo de vida e dedicação, sempre acreditando nas minhas empreitadas.

Ao meu marido, Lucas Gabriel Inácio Salina, pela paciência, cumplicidade e amor incondicional.

A FHEMOAM que financiou este estudo e o meu treinamento.

A equipe do laboratório do Instituto de Oncologia Pediátrica (IOP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), especialmente, a pesquisadora Elizabete Delbuono, responsável pelo meu treinamento.

A Prof^a Dr^a. Leny da Mota Passos que me deu a oportunidade de realizar este trabalho sendo minha orientadora.

Ao Prof Dr. Marcelo Távora Mira que através do programa visitante Senior da FAPEAM participou ativamente das etapas desse estudo fortalecendo o processo do meu aprendizado.

A Prof^a Msc. Eliana Brasil Alves pela honrosa missão que desenvolvemos juntas na implantação da detecção de doença residual mínima por citometria de fluxo no Estado do Amazonas.

Aos colegas dos diversos setores da FHEMOAM envolvidos neste projeto, pelo envolvimento e parceria.

Aos meus queridos pacientes da FHEMOAM que acreditam e depositam confiança no meu trabalho.

Aos meus queridos e eternos pacientes que já cumpriram sua missão no plano terreno e agora estão no mundo espiritual.

Aos amigos do mestrado, pela união que nos incentiva.

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é o câncer mais comum na infância, proveniente da expansão clonal de precursores linfóides imaturos da linhagem B ou T. A LLA representa cerca de 75% dos casos de leucemia em crianças com idade menor que 15 anos e apenas 20% dos casos em adultos. Atualmente o incremento na sobrevida da LLA em pediatria é decorrente de avanços no diagnóstico, estabelecimento de fatores prognósticos e utilização de tratamentos ajustados aos grupos de risco. A estratificação de risco de recaída pode variar conforme o protocolo de terapia, mas, em geral, constituem fatores prognósticos relevantes: idade e contagem leucocitária ao diagnóstico, imunofenótipo, presença de linfoblastos no sistema nervoso central, análise citogenética de anormalidades cromossômicas e evidência de doença residual mínima (DRM) nas crianças em remissão clínica e morfológica. Atualmente o melhor preditor de prognóstico na LLA na infância é o monitoramento da DRM. Baseado em seus resultados, é possível otimizar a quimioterapia, minimizando toxicidade e diminuindo risco de recaída. Neste contexto, esse estudo teve como objetivo principal avaliar a aplicação da DRM na estratificação de risco de recaída em crianças portadoras de LLA B durante a terapia de indução e comparar com critérios clínicos e laboratoriais de estratificação de risco de recaída. Foram incluídos pacientes de 1-17 anos diagnosticados com LLA B *de novo* na fase de indução quimioterápica, utilizando amostra por conveniência do período de janeiro de 2014 a janeiro de 2015. A DRM foi detectada por citometria de fluxo (CF-DRM) com base na identificação de fenótipos anômalos como marcadores de doença residual. Os resultados evidenciaram correlação entre contagem manual de blastos e CF-DRM em amostras com mais de 5% de blastos do D8 ($r= 0,54$; $p=0.0008$) e D15 ($r=0,91$; $p<0.0001$). Observou-se que a pesquisa de CF-DRM em estágios precoces do tratamento reconheceu grupos de pacientes que sofreriam re-estratificação de risco mais tardiamente no protocolo GBTLI-2009. No caso dos pacientes inicialmente alto risco os resultados sugerem que níveis de CF-DRM $\geq 1\%$ no D8 podem identificar precocemente os pacientes que serão re-estratificados em respondedores lentos no D15 ($p=0,0097$). A pesquisa de CF-DRM no D35 foi capaz de detectar uma parcela de pacientes com DRM positiva (37,9%) apesar da completa remissão morfológica, podendo se tornar uma alternativa em locais onde a pesquisa de PCR-DRM não está implantada. Esses dados apontam a relevância da inclusão do resultado da pesquisa de DRM na estratificação de risco durante a terapia de indução.

Palavras chaves: leucemia, doença residual mínima, prognóstico

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer, descendant from the clonal expansion of immature lymphoid precursors from both B or T lines. The ALL accounts for about 75% of cases of leukemia in children younger than 15 years and only 20% of the adult cases. The current increase in survival of ALL in children is due to advances in diagnosis, establishment of prognostic factors and the use of treatments according to risk groups. The relapse risk stratification may vary by therapy protocol, but in general, are important prognostic factors: age and white blood cell count at diagnosis, immunophenotype, presence of lymphoblasts in the central nervous system, cytogenetic analysis of chromosomal abnormalities and evidence of minimal residual disease (MRD) in children in clinical and morphological remission. Currently the best predictor of prognosis in acute lymphoid leukemia in childhood is monitoring the MRD. Based on their findings, it is possible to optimize chemotherapy while minimizing toxicity and decreasing risk of relapse. In this context, this study aimed to evaluate the MRD application in relapse risk stratification in children with B ALL during induction therapy and compare with clinical and laboratorial criteria for relapse risk stratification. The study included 1-17 years old patients recently diagnosed with B ALL in chemotherapy induction phase, using a convenience sample from January 2014 to January 2015. The MRD was detected by flow cytometry (FC-MRD) based on identifying anomalous phenotypes as residual disease markers. Results demonstrated correlation between manual blasts count and CF-MRD samples with more than 5% blasts D8 ($r = 0.54$; $p = 0.0008$) and D15 ($r = 0.91$; $p < 0.0001$). It was observed that the CF-MRD research in the early stages of treatment recognized groups of patients who suffer risk of re-stratification later in GBTLI-2009 protocol. In the case of high risk patients the results initially suggest that levels of CF-MRD $\geq 1\%$ in early D8 may identify patients who will be re-laminated in slow responders at D15 ($p = 0.0097$). The CF-MRD search on D35 was able to detect a portion of patients with positive MRD (37.9%) despite complete morphological remission, and can become an alternative way for locations where the PCR-MRD survey is not available. These data shows the importance of including the outcome of MRD research in risk stratification during induction therapy.

Keywords: leukemia, minimal residual disease, prognosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da hematopoese normal	04
Figura 2- Linfoblastos ao esfregaço medular.....	05
Figura 3- Esquema terapêutico para LLA B Baixo Risco (GBTLI-2009).....	22
Figura 4- Esquema terapêutico para LLA B Alto Risco (GBTLI-2009).....	23
Figura 5- Representação esquemática da citometria de fluxo.....	31
Figura 6- Representação gráfica da aquisição em citometro de fluxo.....	31
Figura 7- Fluxograma dos pacientes durante a terapia de indução.....	39
Figura 8- Fluxograma da contagem manual de blastos e CF-DRM.....	41
Figura 9- Distribuição segundo a frequência da DRM no D8, D15 e D35.....	42
Figura 10- Correlação entre contagem manual de blastos e CF-DRM D8....	42
Figura 11- Correlação entre contagem manual de blastos e CF-DRM D15..	43
Figura 12- Correlação entre contagem manual de blastos e CF-DRM D35..	43
Figura 13- Fluxograma da re-estratificação de risco (Baixo Risco).....	47
Figura 14- Fluxograma da re-estratificação de risco (Alto Risco).....	48
Figura 15- Fluxograma do seguimento da CF-DRM.....	49
Figura 16- Comparação entre o resultado da CF-DRM no D8 em SP com a estratificação de risco do D15 para pacientes inicialmente baixo risco (BR) ao diagnóstico.....	50
Figura 17- Comparação entre o resultado da CF-DRM no D8 em SP com a estratificação de risco do D15 para pacientes inicialmente alto risco (AR) ao diagnóstico.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição segundo a frequência do perfil socioeconômico, etário, cor, gênero, naturalidade e procedência das crianças portadoras de LLA, Manaus - AM.....	36
Tabela 2- Distribuição segundo a frequência das características clínicas e laboratoriais das crianças portadoras de LLA, Manaus - AM.....	37
Tabela 3- Distribuição segundo a frequência da estratificação de risco de recaída ao diagnóstico das crianças portadoras de LLA, Manaus - AM...	38
Tabela 4- Distribuição segundo a frequência do gênero, idade e leucócitos em relação ao DRM no D8, D15 e D35 das crianças portadoras de LLA, Manaus AM.....	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Classificação imunofenotípica da LLA B	06
Quadro 2- Classificação imunofenotípica da LLA T	06
Quadro 3- Classificação para neoplasias de precursor linfóide	07
Quadro 4- Estratificação de risco ao diagnóstico da LLA B (GBTLI-2009)...	12
Quadro 5- Marcadores anômalos para LLA T.....	15
Quadro 6- Marcadores anômalos para LLA B.....	15
Quadro 7- Estratificação de risco no D8, D15 e D35 da LLA B (GBTLI- 2009).....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo: Anticorpo Monoclonal
AM: Amazonas
APC: Aloficocianina
ARRL: Alto Risco Respondedor Lento
ARRR: Alto Risco Respondedor Rápido
BRI: Baixo Risco Intermediário
BRV: Baixo Risco Verdadeiro
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
CD: Cluster Designation
CF: Citometria de Fluxo
CF-DRM: Doença Residual Mínima por Citometria de Fluxo
COG: Children's Oncology Group
D8: Oitavo dia da Terapia de Indução
D15: Décimo quinto dia da Terapia de Indução
D35: Trigésimo quinto dia da Terapia de Indução
DRM: Doença Residual Mínima
EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
FHMOAM: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
FISH: Hibridação Fluorescente *in situ*
FRALLE: *French Acute Lymphoblastic Leukemia Group*
FITC: Isotiocianeto de Fluorceína
GBTLI: Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis
Ig: Imunoglobulinas
ISCN: *Cytogenetic Nomenclature*
LLA : Leucemia Linfóide Aguda
LMA: Leucemia Mielóide Aguda
MGG: May-Grünwald-Giemsa
MO: Medula Óssea
M₁: <5% de blastos na medula óssea
M₂: 5-25% blastos na medula óssea
M₃: > 25% blastos na medula óssea
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-DRM: Doença Residual Mínima por Reação em Cadeia da Polimerase
PE: Ficoeritrina
PerCep: Proteína Clorofila Peridinina
SLE: Sobrevida Livre de Eventos
SNC: Sistema Nervoso Central
SP: Sangue Periférico
St.Jude: *Jude Children Research Hospital*
TCLE: Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TPOG: *Taiwan Pediatric Oncology Group*
TCR: Receptores de Células T
WHO: *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Leucemia Linfóide Aguda	01
1.1.1 Definição e Histórico.....	01
1.1.2 Epidemiologia e Etiopatogenia.....	02
1.1.3 Diagnóstico Clínico, Laboratorial e Classificação.....	04
1.1.4 Critérios de Estratificação de Risco de Recaída.....	08
1.1.5 Tratamento.....	12
1.2 Doença Residual Mínima.....	13
1.2.1 Definição e Histórico.....	13
1.2.2 Métodos para estudar DRM.....	14
1.2.3 Aplicabilidade na Estratificação de risco e Prognóstico.....	17
1.2.4 Aplicabilidade no Planejamento Terapêutico.....	20
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 Geral.....	25
3.2 Específicos.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Modelo de estudo.....	26
4.2 Universo do estudo.....	26
4.3 Pacientes.....	27
4.4 Coleta dos materiais biológicos.....	27
4.5 Processamento e análise dos materiais biológicos.....	29
4.6 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	58
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9 ANEXOS	67
9.1 Termo de consentimento livre esclarecido.....	68
9.2 Ficha clínica do paciente	69
9.3 Fluxograma da coleta dos materiais biológicos	70
9.4 Sistematização das etapas do estudo.....	71
9.5 Protocolos de coleta dos materiais biológicos.....	72
9.6 Protocolos de processamento dos materiais biológicos.....	74
9.7 Procedimento operacional padrão para pesquisa de DRM.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfóide Aguda

1.1.1 Definição e Histórico

A palavra leucemia tem origem grega (leukos – branco e aimá – sangue) e corresponde a um conjunto de neoplasias malignas do sistema hematopoético que acometem o precursor imaturo da linhagem linfóide (linfoblasto) ou mielóide (mieloblasto) ^(6,38,49).

A compreensão atual da leucemia tem como base um processo histórico de aproximadamente 200 anos ^(8,26,36). Os primeiros registros sugestivos dessa patologia foram relatados no início do século XIX em 1811 por Peter Cullen, médico cirurgião, que descreveu um paciente com aparência leitosa do plasma sanguíneo. Alfred Velpeau, em 1825, definiu os sintomas associados à patologia após observar que o sangue tinha uma consistência diferente do "normal", especulando que a etiologia seria o aparecimento de "corpúsculos brancos" ^(44,55). John Bennett, em 1845, introduziu o termo "leucocitemia" e, no mesmo ano, Alfred Donné, publicou a descrição e ilustração das alterações microscópicas identificadas em tais pacientes ⁽⁸⁾.

Rudolf Virchow afirmou que a aparência leitosa do sangue era devido ao desequilíbrio entre a quantidade de células vermelhas (hemácias) e células brancas (leucócitos) e introduziu o termo leucemia em 1847 ^(36,44). Em 1872, o patologista Ernst Neumann, afirmou que a doença era proveniente de um distúrbio da formação das células sanguíneas na medula óssea (MO). Em 1900, o hematologista Swiss Naegeli distinguiu as linhagens celulares, descrevendo pela primeira vez o precursor linfóide e mielóide, sendo a base para classificação das leucemias. Nessa ocasião, surgiu o termo leucemia linfóide aguda (LLA) para definir a expansão clonal do precursor linfóide imaturo na MO ^(8,26,36,44,55).

Ao final do século XIX, graças aos avanços descritos, um melhor entendimento da leucemia foi estabelecido, porém, sem progressos na terapêutica. Ao longo dos primeiros cem anos após sua descrição, a leucemia foi considerada invariavelmente fatal, apesar de múltiplas tentativas com base no uso de arsênio, radiação e torium-X. As combinações de quimioterápicos começaram a ser utilizadas somente no século XX, década de quarenta, com melhores resultados terapêuticos ⁽⁸⁾.

Os progressos em relação à leucemia continuaram e, atualmente, o refinamento do diagnóstico com técnicas de biologia molecular, utilização de tratamentos ajustados aos grupos de risco de recaída e melhorias no suporte clínico, proporcionam excelentes resultados terapêuticos ^(8,44).

1.1.2 Epidemiologia e Etiopatogenia

Leucemia é a doença maligna mais comum na criança e no adolescente, correspondendo a aproximadamente 30% dos casos de câncer da infância. A LLA é o tipo de leucemia mais diagnosticado e representa 75 a 80% dos casos em menores de 15 anos e apenas 20% dos casos em adultos ^(38,49,70). A doença atinge mais frequentemente crianças entre 2 e 5 anos, com discreto predomínio no sexo masculino comparado ao feminino (1,2:1) e na raça branca em relação à negra (1,8:1) ^(19,49).

A incidência mundial da LLA varia entre 10 a 15 casos por 100.000 crianças na faixa etária de 0 a 15 anos. No Brasil, o percentual mediano de incidência das leucemias na infância, em relação aos demais tumores infantis, é de 29% (variando entre 19,0 - 42,5%), com o maior percentual localizado na cidade de Manaus, capital do Estado do Amazonas (AM), região norte do país ⁽⁵¹⁾. Dados do registro hospitalar do serviço de referência no atendimento de doenças hematológicas no Amazonas (Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM) revelam que, nos últimos cinco anos, foram diagnosticados 198 casos novos de LLA em crianças, uma média de 40 casos novos por ano.

Atualmente a taxa de sobrevida livre de doença da LLA em pediatria alcança 80-85% nos países desenvolvidos. Esse incremento é decorrente de avanços no refinamento do diagnóstico, estabelecimento de fatores prognósticos, utilização de tratamentos ajustados aos grupos de risco de recaída e melhorias no suporte clínico ^(58,67).

Dados brasileiros do último estudo do Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias na Infância (GBTLI) revelaram que, em sete anos de seguimento, a taxa de sobrevida livre de eventos das crianças que foram tratadas pelo protocolo GBTLI-99 foi de aproximadamente 76,3% para o grupo baixo risco e 59,8% para o grupo alto risco ⁽⁶⁹⁾. A taxa de mortalidade ajustada por idade para leucemias, no Brasil e nas regiões, entre 1979 e 2005 foi de 13,8 por milhão de crianças. No norte e nordeste foi observado aumento das taxas de mortalidade. Para o sexo masculino, a taxa de mortalidade foi de 15,4 casos por milhão, enquanto para o sexo feminino foi de 12,2 por milhão. As maiores taxas foram observadas na região norte (17 por milhão) para o sexo masculino e na região Sul (15 por milhão) para o sexo feminino ⁽⁵¹⁾.

A gênese da LLA envolve uma complexa relação entre predisposição herdada e exposição exógena a agentes potencialmente leucemogênicos, gerando mutações somáticas progressivas e aleatórias em uma única célula progenitora da linfopoiese normal (linfoblasto), tornando-a capaz de proliferar desordenadamente e ocupar a MO (figura 1) ^(12,19,62). Aproximadamente 90% dos casos de LLA apresentam etiologia obscura, porém estudos apontam a exposição à radiação ionizante, cigarro, quimioterápicos, benzeno, infecções prévias e vacinas como condições potencialmente leucemogênicas ^(14,19,46). Exposição a pesticidas e terapia hormonal materna foram recentemente associados à LLA do lactente ⁽³²⁾. Anomalias cromossômicas constitucionais, como síndrome de Down, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e ataxia-telangiectasia, também estão associadas a maior susceptibilidade às leucemias em geral devido a instabilidade cromossômica presente nessas condições patológicas ^(66,68).

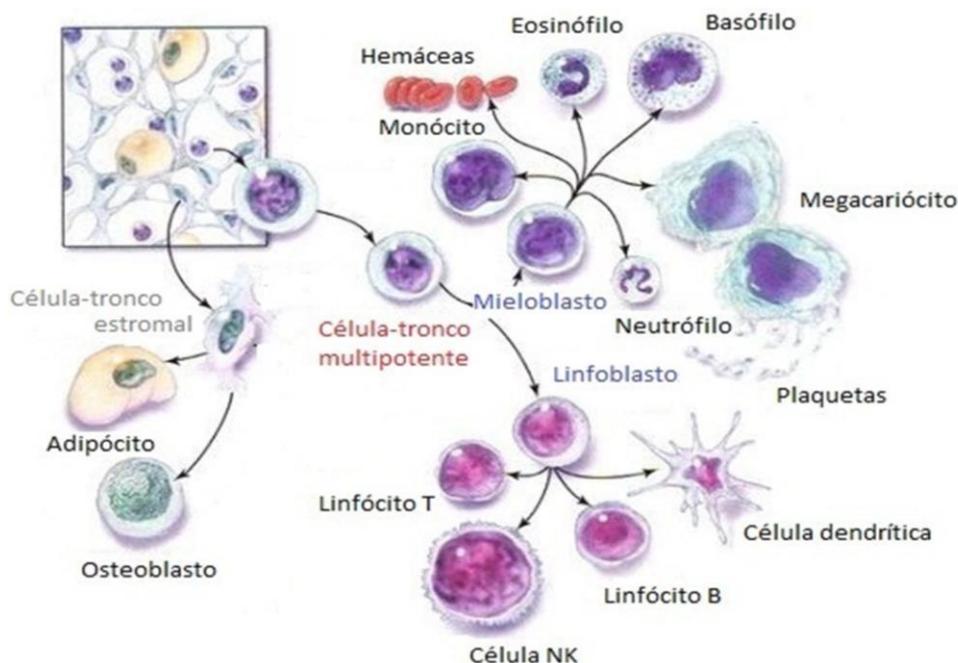


Figura 1 - Representação esquemática da hematopoese normal
(Revista Scientific American,2008)

1.1.3 Diagnóstico Clínico, Laboratorial e Classificação

Os sintomas mais comuns da LLA estão relacionados à insuficiência da MO, sendo eles: síndrome anêmica (fraqueza, palidez cutânea e taquicardia); síndrome trombocitopênica (sangramento gengival, petéquias, hematomas e outras manifestações hemorrágicas); síndrome leucopênica (febre em razão das infecções associadas à neutropenia) e presença de infiltração leucêmica medular (dores ósseas e artralgia) ^(19,49,61).

Ao exame físico, linfadenomegalias, hepatomegalia e esplenomegalia são frequentemente encontradas. Paralisia dos nervos cranianos pode ser observada em pacientes com infiltração leucêmica em sistema nervoso central (SNC) e, raramente, podem ser observados fenômenos compressivos decorrentes do crescimento de gânglios linfáticos ⁽⁴⁹⁾. Os principais diagnósticos diferenciais são as reações leucemóides consequentes a infecção bacteriana ou hemólise aguda, linfocitose aguda de etiologias virais, aplasia medular, calazar, púrpura trombocitopenica imunológica, febre reumática, artrite reumatóide juvenil e infiltração medular de outras causas, como doenças de depósito ou infiltração neoplásica ⁽⁵⁾.

A investigação laboratorial inicia-se com hemograma que pode revelar anemia normocítica e normocrômica, acompanhada de trombocitopenia. A contagem de leucócitos é frequentemente normal ou diminuída e ocasionalmente elevada com presença de linfoblastos ^(5,31). O mielograma (aspirado medular) é a etapa seguinte da investigação e costuma revelar hiper celularidade às custas de linfoblastos na análise citomorfológica do esfregaço; porém, estes podem ser raros em pacientes leucopênicos (figura 2). Laboratorialmente, o diagnóstico definitivo da LLA, segundo a *World Health Organization* (WHO), é baseado na contagem de linfoblastos >25% no esfregaço medular ⁽⁷⁷⁾.

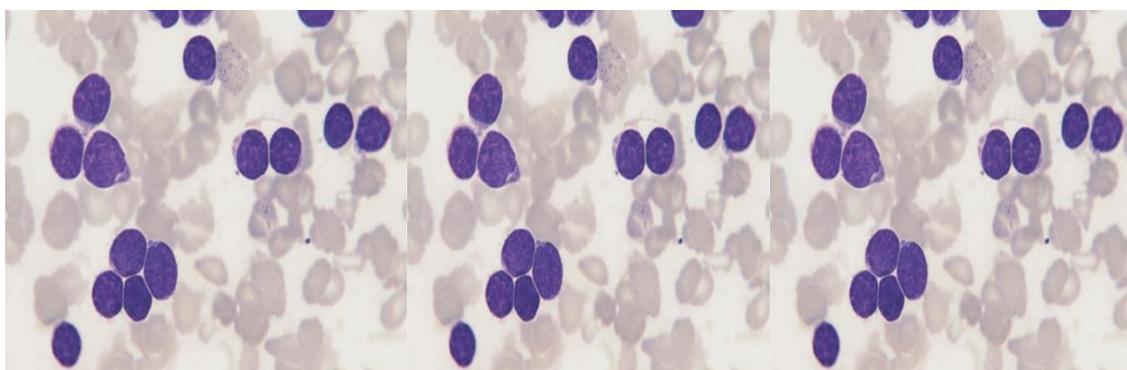


Figura 2 - Linfoblastos ao esfregaço medular. Características morfológicas: alta relação entre o núcleo e citoplasma, cromatina imatura e nucléolos proeminentes

(Bain,2010)

Atualmente o refinamento no diagnóstico e classificação das leucemias é obtido através da incorporação de dados citomorfológicos com os de imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular ⁽⁴⁹⁾. A imunofenotipagem é útil na caracterização fenotípica das células hematopoiéticas patológicas. Trata-se de um processo de classificação com base na expressão de antígenos nucleares, citoplasmáticos e de superfície detectados pela técnica de citometria de fluxo (CF) ⁽⁵⁹⁾. CF é uma técnica multi-paramétrica que utiliza anticorpos monoclonais (AcMo) marcados com fluorocromo para análise qualitativa e quantitativa dos padrões de expressão de antígenos (*Cluster of differentiation* - CD), também denominados marcadores celulares, em populações celulares de interesse ^(33,59). Os testes imunofenotípicos permitem identificar com exatidão as linhagens envolvidas no processo leucêmico e caracterizar o estágio maturativo das mesmas ⁽¹⁹⁾. Aproximadamente 80-85% das LLAs na infância tem fenótipo B,

enquanto 10-15% tem fenótipo T ⁽⁶⁷⁾. LLA B é subclassificada através de marcadores celulares presentes em seus diferentes estágios maturativos (quadro 1). O fenótipo mais frequente na infância é a LLA B comum (75%), seguido da LLA pré-B (15%) e, mais raramente, o fenótipo pró-B (5%) e B maduro (2-5%) ^(34,77). A LLA T divide-se em quatro subgrupos de acordo com os antígenos de diferenciação correspondentes aos níveis de diferenciação intra-tímica normal: LLA pró-T, LLA pré-T, LLA T cortical e LLA T medular (quadro 2) ⁽⁷⁷⁾.

Quadro 1 - Classificação imunofenotípica da LLA B

Fenótipo	Marcadores Celulares
LLA pró-B	TdT, CD34, CD79a, CD19 e CD22 de citoplasma (cCD22)
LLA B comum (Calla)	CD10, cCD22, CD19 e/ou CD20
LLA pré-B	Cadeia μ citoplasmática, CD19, CD20 e CD10
LLA tipo B maduro	Cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (Smlg)

(World Health Organization, 2008)

Quadro 2 - Classificação imunofenotípica da LLA T

Fenótipo	Marcadores Celulares
LLA pró-T	CD3 no citoplasma (cCD3), CD7, CD34
LLA pré-T	cCD3, CD7, CD2, CD34
LLA T cortical	cCD3, CD7, CD2, CD1a
LLA T medular	cCD3, CD7, CD2, CD3 de superfície (sCD3)

(World Health Organization, 2008)

Somado à caracterização fenotípica, o estudo das alterações cromossômicas através da citogenética é outro importante auxiliar no diagnóstico, classificação, orientação e monitoração terapêutica ^(19, 56). A análise do cariótipo pela citogenética convencional pode revelar anormalidades cromossômicas numéricas ou estruturais. Na LLA T, translocações envolvendo os cromossomos 1 e 14 ocorrem em aproximadamente 3% dos casos, como t(1;14)(p33;q11) e t(1;14)(p32;q11). Entre crianças com LLA B, hiperploídia e a translocação t(12;21) são as alterações citogenéticas mais frequentes (25% dos casos), conferindo bom

prognóstico. Os rearranjos recorrentes de mau prognóstico na LLA B ocorrem em menor frequência, destacando-se t(1;19), t(9;22) e a t(4;11), acometendo em média 2 a 5% dos casos ⁽⁵⁰⁾. Nas crianças com estudo citogenético normal, a pesquisa de alterações cromossômicas precisa ser complementada com técnicas baseadas em biologia molecular, como a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) e reação em cadeia da polimerase (PCR) capazes de identificar alterações indetectáveis pela citogenética convencional ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

A classificação das leucemias agudas foi baseada inicialmente nos aspectos clínicos e citomorfológicos da célula blástica, porém, os avanços na imunologia e genética, juntamente com as exigências terapêuticas, levaram à percepção de sua limitação. Atualmente a classificação da WHO (quadro 3), universalmente aceita, incorpora dados imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares, refinando o diagnóstico e plano terapêutico ^(6,31,49,77).

Quadro 3 - Classificação para neoplasias de precursor linfóide

Leucemia/Linfoma linfoblástico B
Leucemia/Linfoma linfoblástico B, NOS
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL</i>
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(v;11q23);rearranjo <i>MLL</i>
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22);TEL-ALM 1 (<i>ETV6-RUNX1</i>)
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com hiperploídia
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com hipoploídia
Leucemia/Linfoma linfoblástico B t(5;14)(q31;q32); <i>IL3-IGH</i>
Leucemia/Linfoma linfoblástico B t(1;19)(q23;p13.3); <i>E2A-PBX1(TCF3-PBX1)</i>
Leucemia/Linfoma linfoblástico T

(World Health Organization, 2008)

1.1.4 Critérios de Estratificação de Risco de Recaída

O estabelecimento de fatores clínicos e laboratoriais como estratificadores de risco de recaída permite agrupar os pacientes em grupos de risco diferenciados e individualizar o tratamento com base na sua probabilidade de recaída. A estratificação de risco no momento do diagnóstico varia conforme o protocolo de terapia, mas, em geral, constituem fatores prognósticos relevantes: idade, contagem leucocitária, linhagem celular, presença de blastos em SNC e análise citogenética de anormalidades cromossômicas ^(53,58,61,67).

Crianças nos grupos etários abaixo de 1 ano e maior ou igual a 9 anos têm um pior prognóstico, sendo estratificadas como alto risco de recaída em contraste com o grupo etário maior ou igual a 1 ano e abaixo de 9 anos, classificado como baixo risco. A alta frequência de características biológicas favoráveis nos linfoblastos dos pacientes do grupo etário de baixo risco, tais como hiperdiploidia (51-65 cromossomos) e a fusão TEL/AML1 t(12;21), explica o seu melhor prognóstico ^(42,67). Os lactentes (abaixo de 12 meses) geralmente tem desfechos desfavoráveis devido à alta leucometria, maior frequência de acometimento do SNC na admissão e alto percentual de rearranjo do gene MLL/AF4 t(4;11) ⁽⁴²⁾. Crianças com idade maior ou igual a 9 anos tem maior frequência de LLA T, apresentam comumente alta leucometria ao diagnóstico, menor incidência de anormalidades citogenéticas de bom prognóstico e uma maior frequência de cromossomo filadélfia t(9; 22), de pior prognóstico. Adolescentes também tendem a apresentar mais complicações do tratamento quimioterápico, tais como, osteonecrose, pancreatite e trombose venosa profunda ^(53,67).

Os protocolos de tratamento tipicamente utilizam a leucometria inicial em sangue periférico (SP) como um fator independente de prognóstico, pois reflete a dimensão da carga tumoral, utilizando como ponto de corte leucometria ≥ 50.000 leucócitos/mm³ para classificar os pacientes como alto risco de recaída ^(53,65,67). Com relação ao imunofenótipo, pacientes com LLA T apresentam prognóstico inferior aos pacientes de LLA B, com maior risco de falha indutória por serem menos sensíveis ao tratamento com metotrexato ^(53,67).

Linfoblastos detectáveis no líquido cefalorraquidiano estão presentes em aproximadamente 15-20% das crianças com LLA ao diagnóstico. O acometimento do SNC é classificado em SNC-1 (sem blastos); SNC-2 (menos do que cinco células blásticas por microlitro) e SNC-3 (mais de cinco células blásticas por microlitro ou paralisia de nervo craniano). Pacientes SNC-3 no momento do diagnóstico tem um risco maior de recaída tanto medular quanto em SNC, e, portanto são classificados como alto risco. Pacientes SNC-1 e SNC-2 ao diagnóstico são classificados como baixo risco de recaída, porém este último receberá intensificação de quimioterapia intra tecal pelo maior risco de recaída nesta topografia ^(53,67,69).

A participação das anormalidades citogenéticas na estratificação de risco de recaída são mais expressivas na LLA B. Hiperdiploidia (51-65 cromossomos ou índice de DNA $\geq 1,16$) e a fusão TEL/AML1 t(12, 21), estão associadas com um prognóstico mais favorável. Anomalias cromossômicas que definem grupo de alto risco são rearranjos do gene MLL no cromossoma 11q23, especialmente t(4,11), cromossoma filadélfia t(9; 22) e hipoploidia (<44 - 45 cromossomos) ^(42,67).

Outros parâmetros prognósticos utilizados por alguns protocolos são o sexo, envolvimento testicular ao diagnóstico e a amplificação intracromossômica do cromossomo 21(iAMP21). Em alguns estudos, o prognóstico para os meninos é pior comparado as meninas e, como resultado desta diferença, em alguns protocolos, tais como *Children's Oncology Group* (COG) e o *Taiwan Pediatric Oncology Group* (TPOG), os meninos recebem fase de manutenção extra ^(53,67). No que tange ao envolvimento testicular, sua importância prognóstica ainda não é tão clara, porém é considerada como característica de alto risco pelos protocolos *St. Jude Children Research Hospital* (St. Jude), COG e TPOG. A amplificação intracromossômica do cromossomo 21(iAMP21), por sua vez, ocorre em menos de 5% da LLA B e é considerada uma característica de alto risco para o *French Acute Lymphoblastic Leukemia Group* (FRALLE) ⁽⁶⁷⁾.

Alguns estudos ao longo dos últimos anos avaliaram o impacto da raça/etnia como fator prognóstico na LLA. A maioria revela um pior prognóstico nas crianças de raça negra comparadas às de raça branca. Outros grupos étnicos/raciais, tais como hispânicos, índios americanos/nativos do Alaska e crianças da Ásia/Ilhas do Pacífico foram estudados, evidenciando um pior prognóstico nos dois primeiros grupos comparado as crianças da Ásia/Ilha do Pacífico ^(9,39,56). Acredita-se que a influência da raça e etnia na sobrevida pode estar relacionada com nível sócio econômico representado pelo fácil acesso ao diagnóstico precoce e aos serviços de saúde especializados que alguns grupos étnicos/raciais tem em detrimento a outros. Ademais, os polimorfismos genéticos dos diferentes grupos podem explicar a variabilidade das respostas aos tratamentos quimioterápicos e, conseqüentemente, das diferenças de sobrevida entre eles ^(21,56).

Outro fator com potencial efeito prognóstico na LLA é a condição nutricional do paciente ao diagnóstico. Na LLA, a frequência de desnutrição nos países em desenvolvimento é de 21- 22% contra 7% nos países desenvolvidos. Nesse grupo de pacientes há menor efetividade e maior toxicidade quimioterápica comparado aos pacientes eutróficos; porém, o impacto prognóstico desse fator ainda não está bem definido. Nos países em desenvolvimento, a maioria dos óbitos em pacientes com LLA ocorrem em crianças desnutridas, sugerindo o estado nutricional ao diagnóstico como um dos principais obstáculos à melhora da sobrevida em pacientes com LLA durante o primeiro ano de tratamento ^(40,47).

A rapidez com que o paciente responde à quimioterapia inicial (terapia de indução da remissão) também é um fator significativo de prognóstico. Os protocolos de tratamento de LLA apresentam em média 30 - 40 dias de terapia de indução e três momentos de avaliação da resposta terapêutica durante esse período.

A maioria dos protocolos considera o oitavo dia da terapia de indução (D8) como primeiro momento de avaliação do tratamento ^(61,65,67). O D8 avalia a resposta do paciente a corticoterapia (prefase) medida através da contagem

manual de blastos presentes no SP. Pacientes com contagem absoluta menor que 1.000 blastos/mm³ são considerados respondedores rápidos e aqueles com contagem maior que 1.000 blastos/mm³, respondedores lentos. A avaliação do D8 apresenta limitações tais como a própria análise morfológica do blasto que pode ser difícil e imprecisa, bem como o ponto de corte utilizado para estratificar resposta, pois não reflete as taxas individuais de redução de blastos ^(60,65).

Perspectivas futuras de refinamento da análise morfológica do D8 em SP poderão revelar a utilidade em se determinar novos pontos de corte para estratificação de risco baseado em taxas de redução individuais de blastos ⁽⁶⁰⁾. Atualmente, a taxa de sobrevida livre de eventos considerando bons e maus respondedores a corticoterapia diferem significativamente (cerca de 80% versus 30-40%) ⁽⁶⁷⁾.

Os outros dois momentos de avaliação da terapia são ao término da segunda e última semana da indução, baseados na contagem manual de blastos em 300 a 500 células no esfregaço medular. A MO é estratificada em M₁: <5% de blastos; M₂: 5-25% blastos e M₃: >25% blastos. Os pacientes com menos de 5% de linfoblastos na medula têm um prognóstico mais favorável comparados àqueles com doença persistente em níveis mais elevados; devendo estes ter o tratamento intensificado de acordo com o protocolo utilizado ^(53,65,67).

No Brasil, a terapia de indução da remissão, de acordo com o protocolo atual de tratamento de LLA na infância (GBTLI-2009) tem duração de 35 dias e utiliza como critérios de estratificação de risco para LLA B: idade, contagem leucocitária, presença de linfoblastos no SNC e análise citogenética de anormalidades cromossômicas ⁽⁶⁹⁾.

A resposta precoce à indução, no GBTLI-2009, é avaliada no D8, décimo quinto dia da indução (D15) e trigésimo quinto dia da indução (D35) com contagem morfológica de blastos em SP para D8 e em MO para D15 e D35, conforme descrito no quadro 4 ⁽⁶⁹⁾.

Quadro 4 - Estratificação de risco ao diagnóstico da LLA B (GBTLI-2009)

Parâmetros para estratificação de risco	Alto risco de recaída	Baixo risco de recaída
Idade	<1 ano ou ≥ 9 anos	≥ 1 ano e <9 anos
Leucometria ao diagnóstico	≥ 50.000 células/mm ³	<50.000 células/mm ³
Envolvimento extramedular (SNC)	SNC-3	SNC-1/SNC-2
Citogenética	Alterações de mau prognóstico	Sem alterações ou com alterações de bom prognóstico
Contagem morfológica de blastos em SP(D8)	≥ 1000 blastos/mm ³	<1000 blastos/mm ³
Contagem morfológica de blastos em MO (D15 e D35)	MO M ₂ /M ₃	MO M ₁

(Sociedade Brasileira de Oncologia, 2011)

1.1.5 Tratamento

O uso de quimioterapia para tratamento de leucemias teve início em 1943 com os agentes citotóxicos alquilantes. Nos anos seguintes, corticóides e antipurinas também começaram a ser utilizados e, em 1961, foi demonstrado que a vincristina, um alcalóide da vinca, era capaz de produzir remissão da LLA. No início dos anos 60, protocolos terapêuticos com finalidade curativa começaram a ser desenvolvidos com destaque para o trabalho pioneiro do *St. Jude Children's Research Hospital* que, utilizando combinação de quimioterápicos, alcançou 50% de taxa de cura com seguimento por mais de 30 anos ^(36,44). Desde então, vários protocolos de tratamento foram desenvolvidos em diversos países e, embora os esquemas terapêuticos possam variar conforme o centro de tratamento, protocolos modernos são constituídos das seguintes fases: indução da remissão, consolidação da remissão, intensificação, consolidação tardia, manutenção da remissão e prevenção da leucemia no SNC ⁽⁸⁾.

Na indução da remissão geralmente são utilizadas quatro drogas (corticóide, vincristine, L-asparaginase e daunoblastina) com o objetivo de eliminar o maior número de linfoblastos. As fases de consolidação e intensificação objetivam erradicar as células leucêmicas residuais através da associação de diversos quimioterápicos. A fase de manutenção da remissão objetiva prevenir a recaída com o uso de 6-mercaptopurina e metotrexate em doses-padrão, conforme o protocolo de tratamento. A prevenção da recaída no SNC também é parte integral do tratamento curativo da LLA através da infusão de quimioterapia intratecal desde a fase de indução. O transplante de células-tronco hematopoéticas, por sua vez, permanece reservado para os pacientes com LLA alto risco e para a maioria daqueles que sofrem recaídas^(8,36,44,55).

No Brasil, o primeiro protocolo multicêntrico de tratamento da LLA infantil foi instituído em 1980, formando o Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda na Infância (GBTLI-80). Atualmente o protocolo encontra-se na sua sexta versão (GBTLI-2009) e tem como base as fases de tratamento acima descritas com ajustes nas doses quimioterápicas, conforme os grupos de risco de recaída^(11,69).

1.2 Doença Residual Mínima

1.2.1 Definição e Histórico

A resposta à terapia de indução da remissão tradicionalmente tem sido avaliada pela contagem morfológica de blastos em SP e MO. A avaliação morfológica nessa fase do tratamento é desafiadora e imprecisa, pois a morfologia das células blásticas é frequentemente indistinguível dos precursores linfóides imaturos normais (hematogônias), particularmente ao término da indução, quando a porcentagem de hematogônias na MO pode ultrapassar 10% da população celular total^(17,54). Além disso, pacientes em remissão morfológica podem apresentar quantidades muito pequenas de blastos leucêmicos residuais, o que levou ao conceito de doença residual mínima (DRM)⁽¹⁵⁾.

A DRM é uma estimativa da carga leucêmica residual presente em pacientes em remissão clínica, que é indetectável pelas técnicas convencionais de análise morfológica da MO ^(17,54). Em 1981, Bradstock e colaboradores foram pioneiros em estudar um método mais sensível e específico que a morfologia convencional para avaliar resposta ao tratamento. O estudo, utilizando microscópio de fluorescência, evidenciou que os linfoblastos apresentavam características imunofenótípicas capazes de diferenciá-los das hematogônias, o que ficou conhecido como imunofenótipo associado à leucemia. Inicialmente esse conhecimento foi aplicado na detecção de DRM na LLA T e posteriormente, com o desenvolvimento de AcMo e CF, foi possível estudá-lo na LLA B ⁽¹⁰⁾.

Paralelamente a estes estudos, ainda na década de 80, pesquisadores aproveitaram o desenvolvimento da técnica de PCR para estudar amplificação de transcritos de fusão e genes receptores de antígenos como metodologia de detecção de DRM em LLA ^(7,23). Tais metodologias sofreram incrementos ao longo dos anos e estão sendo incorporadas na maioria dos protocolos de tratamento de LLA na infância ^(7,25,69).

1.2.2 Métodos para estudar DRM

Atualmente, três métodos são utilizados para pesquisar DRM: análise de fenótipo anômalo por CF, análise de PCR dos produtos de fusão de translocações cromossômicas e análise de PCR de rearranjos clone específicos de genes de imunoglobulinas (Ig) ou receptores de células T (TCR). Esses métodos permitem a identificação de uma célula leucêmica entre 10.000 a 100.000 células normais (10^{-4} a 10^{-5}) cuja sensibilidade é 100 a 1.000 vezes maior que as técnicas citomorfológicas convencionais ⁽³⁸⁾.

A pesquisa de DRM por CF (CF-DRM) é uma técnica multi-paramétrica cuja base metodológica é a identificação de imunofenótipos associados às células malignas (fenótipo anômalo) por meio de combinações de AcMo marcados com fluorocromos ^(17,37). O fenótipo anômalo pode ser expresso nos blastos leucêmicos das seguintes formas: infidelidade de linhagem (expressão de marcadores

mielóides em blastos linfóides), assincronia de maturação (co-expressão de dois ou mais marcadores que não estão presentes simultaneamente no processo maturativo normal), intensidade da expressão dos marcadores (perfil de intensidade de fluorescência do marcador diferente do padrão de normalidade) ou expressão ectópica de marcadores (presença de um marcador que seria normal caso a célula estivesse em outra localização) (quadros 5 e 6) ^(17,27,37,54). Em 90% dos pacientes com LLA, imunofenótipos associados à leucemia podem ser definidos ao diagnóstico e utilizados para monitorar DRM com sensibilidade de 0,01%, ou seja, uma célula leucêmica dentre 10^{-4} células normais ⁽¹⁵⁾.

Quadro 5: Marcadores anômalos para LLA T

Parâmetro	Marcador	Normal	Anômalo
Expressão ectópica de antígenos	Combinação de CD3/TdT	-Negativos na MO -Positivos durante a maturação da célula T no timo	Positivos na MO

(Campana *et al.*, 1999)

Quadro 6: Marcadores anômalos para LLA B

Parâmetro	Marcador	Normal	Anômalo
Intensidade da expressão	CD45	Fraca intensidade	Negativo
	CD38	Forte intensidade	Fraca intensidade
	CD58	Fraca intensidade	Forte intensidade
Infidelidade de linhagem	CD13	Ausente	Presente
	CD56	Ausente	Presente
	CD33	Ausente	Presente
	CD66c	Ausente	Presente
	CD15	Ausente	Presente
	CD65	Ausente	Presente
Assincronia de maturação	CD21	Ausente	Presente
	Combinação de CD10/CD19/CD34	Ausentes	Presentes

(Campana *et al.*, 1999)

No que tange às metodologias baseadas em PCR para detecção de DRM, a análise de produtos de fusão de translocações cromossômicas utilizando *primers* consenso é factível em aproximadamente 40% das crianças com LLA. O princípio fundamental da técnica está baseado na identificação de células leucêmicas através da presença de translocações cromossômicas que formam transcritos de fusão exclusivos do linfoblastos, podendo diferenciá-los das células saudáveis. Os transcritos de fusão amplamente usados para a detecção da DRM são: BCR-ABL1, MLL-AFF1, TCF3-PBX1, e ETV6-RUNX. Em teoria a sensibilidade de 0,001% (10^{-5}) é alcançada, mas na prática, sensibilidade de 0,01% (10^{-4}) é mais comumente observada ⁽³⁸⁾.

Entre os métodos baseados em PCR, a análise de rearranjos clone específicos de Ig e TCR tem se tornado amplamente aceita para quantificar DRM em pacientes com LLA. Tal análise é estritamente quantitativa, baseada na identificação de sequências de regiões juncionais paciente-específicas que são exclusivas do clone leucêmico, formando uma assinatura molecular. Através dessa metodologia aproximadamente 90% dos casos de LLA infantil podem ser monitorados com uma sensibilidade de detecção de uma célula leucêmica entre 10.000 a 100.000 células normais. ^(19,54,63,64)

A correlação entre os métodos existentes para detecção de DRM é similar quando DRM presente em nível $\geq 0,01\%$, justificando esse valor como ponto de corte de positividade ^(17,18,19,37). A CF-DRM tem como vantagens: rapidez do método, quantificação de DRM em células vivas por meio de marcadores celulares de viabilidade, análise do estado de maturação das células hematopoiéticas normais e a possibilidade de avaliar o grau de hemodiluição e recuperação hematopoiética na amostra estudada. As principais desvantagens da CF-DRM são: menor sensibilidade comparada ao técnicas de PCR, modulação do fenótipo anômalo durante o tratamento, custo elevado dos anticorpos e necessidade de treinamento intenso para interpretação dos resultados. PCR-DRM é mais sensível e de fácil interpretação, porém, suas principais desvantagens são: modulação dos rearranjos durante o tratamento, maior custo para implantação da técnica, incapacidade de distinguir entre células viáveis e

apoptóticas e a demora do resultado comparado à CF-DRM, principalmente devido a necessidade de desenhar primers paciente-específicos ^(18,38).

A seleção do método de detecção de DRM depende basicamente da experiência da equipe e do arsenal técnico disponível, porém é possível que exista vantagem na utilização de PCR-DRM ao término da indução, devido a maior sensibilidade. Estudos revelam que uma boa estratégia é utilizar preferencialmente CF-DRM independentemente do momento de avaliação, e realizar PCR-DRM apenas se não forem identificados imunofenótipos associados a leucemia ⁽¹⁶⁾. O protocolo brasileiro (GBTLI-2009), determina que os pacientes sejam estratificados pela morfologia nos centros de tratamento onde a detecção de DRM é indisponível, porém, se DRM disponível, esta deve prevalecer nas decisões terapêuticas e ser realizada no D15 por CF e D35 por PCR ⁽⁶⁹⁾.

1.2.3 Aplicabilidade na estratificação de risco e Prognóstico

A principal aplicação da detecção de DRM é a identificação de pacientes que apesar de alcançarem remissão morfológica, ainda permanecem com níveis consideráveis de clones leucêmicos residuais. Nesse contexto, estudos revelaram que pacientes em completa remissão morfológica ainda podem apresentar positividade de DRM variando entre 39% e 44% ⁽²⁷⁾.

Os momentos de avaliação da DRM seguem os da avaliação morfológica da MO, na dependência do protocolo de tratamento utilizado. Tradicionalmente, DRM é pesquisada ao término da segunda semana da terapia de indução da remissão e no último dia da indução, enquanto que apenas alguns protocolos avaliam DRM ao término da primeira semana da indução ^(17,25,75,76).

Há aproximadamente uma década e meia, estudos envolvendo a detecção de DRM demonstraram seu grande potencial prognóstico na LLA da infância, sendo incorporada como critério de estratificação de risco. Atualmente, DRM é considerada o mais importante preditor de risco de recaída da LLA em pediatria. Baseado em seu resultado, é possível otimizar a quimioterapia, minimizando

toxicidade e diminuindo risco de recaída ^(7,25,69). O prognóstico nos pacientes que apresentam favorável clearance de células leucêmicas no final da indução (DRM <0,01%) é expresso pela sobrevida livre de eventos (SLE) em cinco anos de 88%. Aqueles pacientes com DRM acima de 0,01% apresentam SLE variando de 30% ±8% à 59%±5% em cinco anos ⁽¹³⁾.

Recentemente, o potencial prognóstico da DRM foi avaliado ao término da primeira semana da indução no D8. Pacientes com DRM negativa (<0,01%) apresentaram SLE, em cinco anos, de aproximadamente 90%. Além disso, o estudo revelou que altos níveis de DRM no D8 (>1%), mesmo nos pacientes com DRM negativa ao término da indução, propiciam queda na SLE para 79%±4% em cinco anos. Portanto, estratificar os pacientes nesse momento parece ser um fator independente de prognóstico em longo prazo e mais estudos são necessários no sentido de comparar o resultado da DRM no D8 com a contagem manual de blastos em SP, com vistas a uma possível incorporação da detecção de DRM também neste momento, como critério universal de estratificação de risco ⁽¹³⁾.

No protocolo GBTLI-2009, a aplicação do resultado da DRM na estratificação de risco em LLA B ocorre da seguinte forma: o grupo inicialmente classificado como baixo risco de recaída ao diagnóstico (grupo etário maior ou igual a 1 ano e abaixo de 9 anos, ausência de acometimento em SNC e ausência de achados citogenéticos de mau prognóstico) é re-estratificado em dois subgrupos de acordo com a intensidade da resposta terapêutica à indução. O primeiro subgrupo é denominado Baixo Risco Verdadeiro (BRV), sendo composto pelos pacientes que apresentam menos de 1000 blastos/mm³ no SP do D8, estado leucêmico M₁ com CF-DRM negativa (<0,01%) no D15 do tratamento e medula M₁ com PCR-DRM negativo (<10⁻³) no final da indução (D35). O segundo subgrupo, denominado Baixo Risco Intermediário (BRI), é composto pelos pacientes que apresentam menos de 1000 blastos/mm³ no SP do D8, MO M_{1/2} com CF-DRM positiva em níveis intermediários (≥0,01% - <10%) no D15 do tratamento e medula M₁ com PCR-DRM negativo (< 10⁻³) no final da indução (D35). Aqueles pacientes inicialmente incluídos no grupo de baixo risco são transferidos para o grupo de alto risco – respondedores lentos se apresentarem

qualquer um dos seguintes critérios: ≥ 1000 blastos/ mm^3 no SP do D8 e/ou estado leucêmico M_3 com CF-DRM positiva ($\geq 10\%$) no D15 do tratamento e, adicionalmente, medula $M_{2/3}$ com PCR-DRM positivo ($\geq 10^{-3}$) no final da indução (D35). Nos casos em que não houver resultados disponíveis de CF-DRM no D15 ou PCR-DRM no D35, as crianças com MO M_3 no D15 e/ou MO $M_{2/3}$ no D35, serão transferidas para o Grupo de Alto Risco – Respondedor Lento (ARRL) (quadro 7) ⁽⁶⁹⁾.

Os pacientes classificados inicialmente como alto risco de recaída devido a presença de pelo menos um dos seguintes critérios (grupo etário abaixo de 1 ano e maior ou igual a 9 anos, acometimento em SNC ou achados citogenéticos de mau prognóstico) serão re-estratificados em dois subgrupos de acordo com a intensidade da resposta terapêutica à indução. O primeiro subgrupo é denominado "Alto Risco Respondedor Rápido (ARRR)" e é composto pelos pacientes que apresentam menos de 1000 blastos/ mm^3 no SP no D8, estado leucêmico $M_{1/2}$ com CF-DRM $< 10\%$ no D15 do tratamento e medula M_1 com PCR-DRM negativo ($< 10^{-3}$) no final da indução (D35). O segundo subgrupo é denominado "Alto Risco Respondedor Lento (ARRL)" e é composto pelos pacientes que apresentam ≥ 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico no D8 e/ou estado leucêmico M_3 com CF-DRM $\geq 10\%$ no D15 do tratamento, e/ou medula $M_{2/3}$ com PCR-DRM positivo ($\geq 10^{-3}$) no final da indução (D35). Nos casos em que não houver resultados disponíveis de CF-DRM no D15 ou PCR-DRM no D35, as crianças com MO M_3 no D15 e/ou MO $M_{2/3}$ no D35, serão classificadas no subgrupo respondedor lento (quadro 7) ⁽⁶⁹⁾.

Independentemente do grupo de risco de recaída, nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou do PCR-DRM (D35), será considerado o critério citomorfológico da MO. Ademais, nos casos de discordância de resultados entre DRM e morfologia, prevalece a DRM para as decisões terapêuticas ⁽⁶⁹⁾.

Quadro 7 - Estratificação de risco no D8, D15 e D35 da LLA B (GBTLI-2009)

Subgrupos	BRV	BRI	ARRR	ARRL
D8 (SP/blastos/mm ³)	<1.000	<1.000	<1.000	≥1000
D15 (MO/CF-DRM %)	M ₁ <0,01	M _{1/2} ≥0,01 - <10	M _{1/2} <10	M ₃ ≥10
D35 (MO/PCR-DRM)	M ₁ <10 ⁻³	M ₁ <10 ⁻³	M ₁ <10 ⁻³	M _{1/2/3} ≥10 ⁻³

BRV: baixo risco verdadeiro; BRI: baixo risco intermediário; ARRR: alto risco respondedor rápido ARRL: alto risco respondedor lento

(Sociedade Brasileira de Oncologia, 2011)

1.2.4 Aplicabilidade no planejamento terapêutico

A incorporação do resultado na DRM no manejo terapêutico também varia conforme o protocolo de tratamento, porém, a base da intervenção é intensificar a quimioterapia para os pacientes alto risco e diminuir as doses quimioterápicas para os pacientes baixo risco, prevenindo toxicidade a curto e longo prazo e diminuindo as taxas de recaída ^(19,38,49,69).

No protocolo GBTLI-2009, para todos os pacientes portadores de LLA B baixo risco é realizada a prefase com prednisona (PRED) 60 mg/m²/dia por 7 dias e uma injeção intratecal do metotrexate (MTX IT) no dia 1 (D1) do tratamento. Após a terapia inicial da prefase, pacientes com mais de 1000 blastos/mm³ em SP no D8 serão transferidos para o grupo de alto risco. Aqueles classificados como baixo risco verdadeiro (<1000 blastos/mm³ no D8 e MO M₁ no D15 com negatividade da CF-DRM <0,01%) iniciam a terapia da indução em 4 semanas com dexametasona (DEXA), vincristina (VRC), daunoblastina (DNR), asparaginase (L-Asp) e tripla terapia intra-tecal (MADIT) composta de metotrexate, dexametasona e aracetin. Os pacientes classificados no subgrupo baixo risco intermediário com medula M_{1/2} com CF-DRM positiva em níveis intermediários (≥ 0,01% - <10%) no D15 da terapia, receberão duas doses adicionais da DNR previstas para os dias 22 e 29 da indução. Os pacientes com medula M₁ no D15 e com negatividade da CF-DRM (<0,01%) ficarão sem estas duas doses da DNR. Serão transferidos para o grupo de alto risco aqueles com medula M₃ no D15 e com CF-DRM (≥10%) (Figura 3) ⁽⁶⁹⁾.

Após o término da indução, conseguida a remissão clínica completa (RCC), imediatamente se prossegue com a terapia de consolidação da remissão por quatro semanas com mercaptopurina (6-MP), citarabina (ARA-C) e tripla terapia intratecal com MADIT, acrescentando-se nessa fase duas doses de ciclofosfamida (CICLO) apenas para o grupo baixo risco respondedor intermediário. A fase seguinte é a intensificação e tem duração de 8 semanas com 4 infusões quinzenais do MTX em doses de $2\text{g}/\text{m}^2$, 6-MP e quatro injeções da tripla terapia intra-tecal com MADIT. Essa fase é igual para os dois subgrupos de baixo risco. Antecedendo a manutenção, ocorre a consolidação tardia em 8 semanas com tioguanina (6-TG), doxorubicina (DOXO), DEXA, L-Asp, VRC, ARA-C e tripla terapia intra-tecal com MADIT, acrescentando-se nessa fase uma dose de CICLO apenas para o grupo baixo risco respondedor intermediário. Após a consolidação tardia, ambos os subgrupos finalizam com a terapia de manutenção por 18 meses com 6-MP intermitente, MTX a cada 3 semanas e tripla terapia intra-tecal com a MADIT cada 8 semanas (figura 3) ⁽⁶⁹⁾.

Crianças com LLA B estratificadas inicialmente como alto risco e que forem respondedores rápidos à terapia inicial (<1000 blastos/ mm^3 no SP do D8, medula $M_{1/2}$ com CF-DRM $<10\%$ no dia 15 do tratamento, receberão três doses de DNR na terapia da indução, sem o uso da CICLO neste momento. Nas fases subsequentes de consolidação e interfase esse subgrupo receberá MTX na dose de $2\text{ g}/\text{m}^2$. Os respondedores lentos (≥ 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico do dia 8 e/ou medula M_3 com a CF-DRM $\geq 10\%$ no dia 15, receberão uma dose da DNR no dia 23 da indução, além da introdução da CICLO. Para os pacientes do subgrupo respondedor lento segue-se a fase de consolidação com os blocos VEDA e COPADM seguida da interfase com doses mais elevadas do MTX $5\text{ g}/\text{m}^2$. Ambos os subgrupos finalizam com a terapia de manutenção por 18 meses com 6-MP intermitente, MTX a cada 3 semanas e tripla terapia intra-tecal com a MADIT cada 8 semanas (figura 4) ⁽⁶⁹⁾.

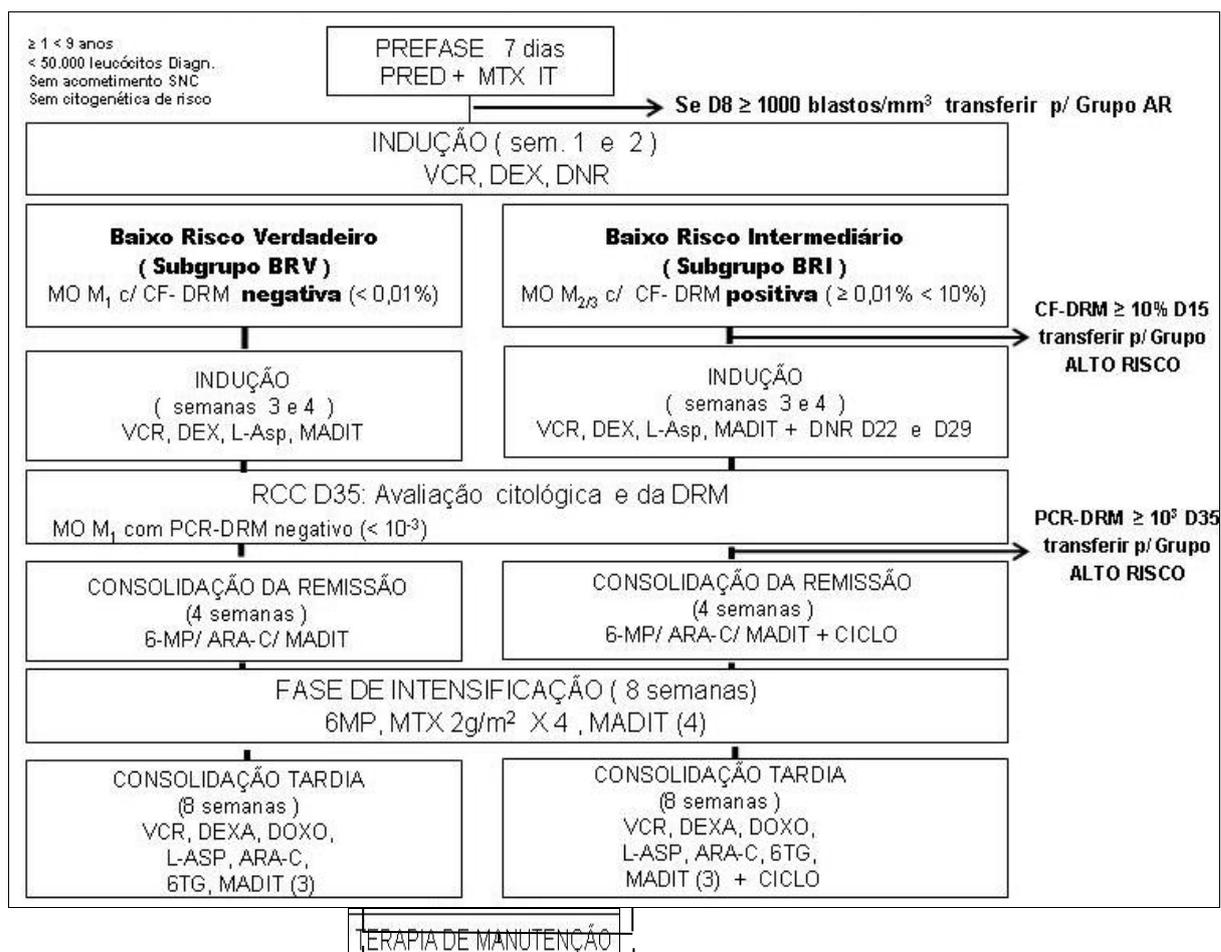


Figura 3 - Esquema terapêutico para LLA B Baixo Risco (GBTLI-2009)
 (Sociedade Brasileira de Oncologia, 2011)

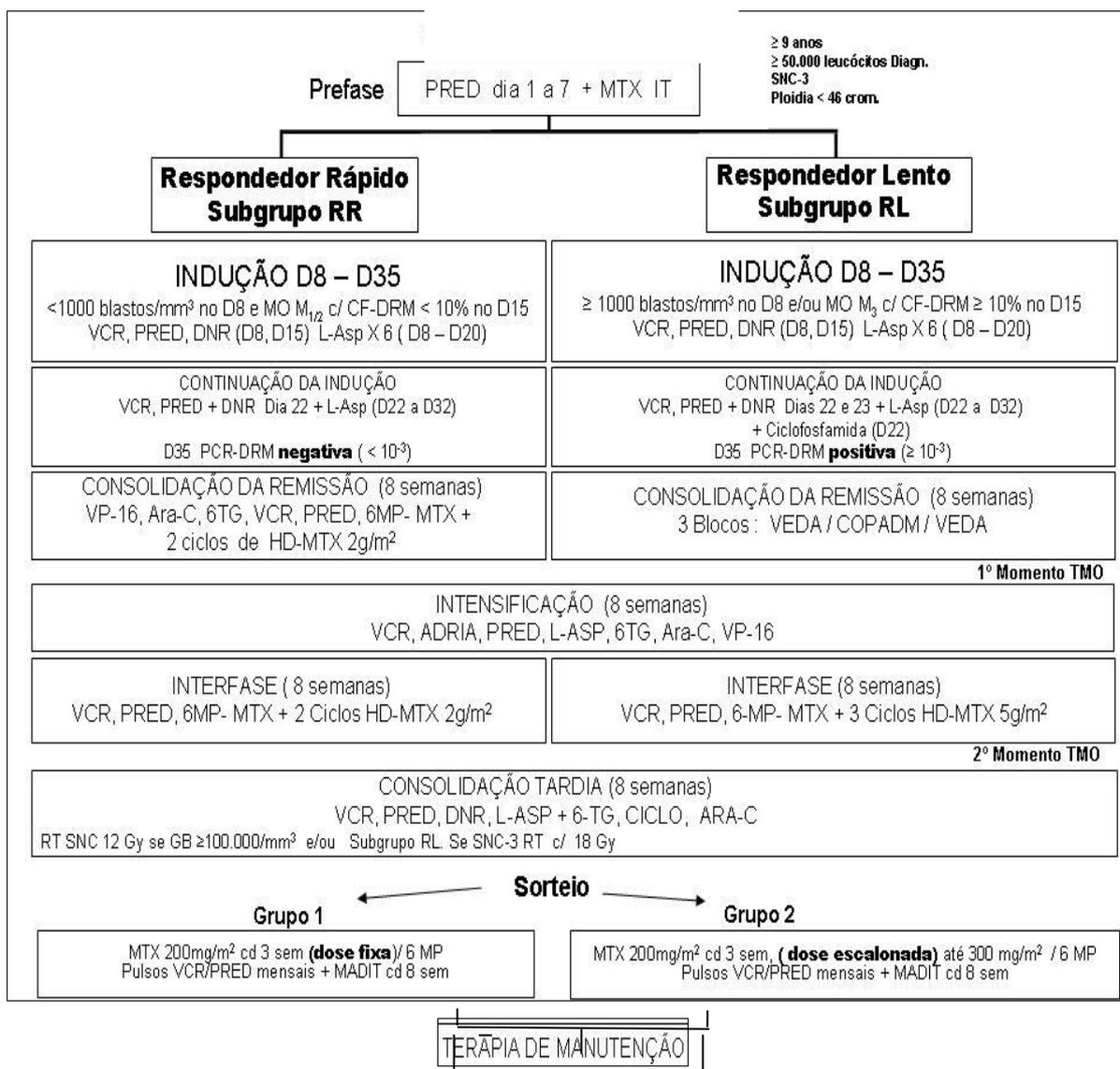


Figura 4- Esquema terapêutico para LLA B Alto Risco (GBTLI-2009)
 (Sociedade Brasileira de Oncologia, 2011)

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente a taxa de sobrevida livre de doença da LLA em pediatria alcança 80-85% nos países desenvolvidos. No Brasil, dados do último estudo Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias na Infância (GBTLI) revelaram que a taxa de sobrevida livre de doença em sete anos das crianças que foram tratadas pelo protocolo GBTLI-99 foi de aproximadamente 76,3% para o grupo baixo risco de recaída e 59,8% para o grupo alto risco de recaída. O incremento nas taxas de sobrevida é decorrente de avanços no refinamento do diagnóstico, estabelecimento de fatores prognósticos, utilização de tratamentos ajustados aos grupos de risco de recaída e melhorias no suporte clínico.

O monitoramento da DRM está consolidado como importante fator prognóstico sendo incorporado como critério de estratificação de risco na maioria protocolos de tratamento e está gradualmente sendo implantado nos Estados brasileiros. Contudo, recentemente, têm surgido questionamentos referentes à utilização da pesquisa de DRM para reestratificar risco em estágios muito precoces do tratamento (término da primeira semana de indução - D8). Atualmente essa questão não é consensual e muitos protocolos utilizam apenas a avaliação morfológica nesse momento. Tal questionamento carece de investigação no contexto do atual protocolo brasileiro GBTLI-2009.

No Amazonas, a FHMOAM constitui o único serviço público de referência no tratamento de leucemias infantis, com uma demanda anual de quarenta novos casos de LLA em crianças. A Instituição atualmente é desprovida de técnicas para detecção da DRM e estratifica os pacientes pela análise morfológica convencional da MO. Nesse contexto, este estudo se justifica (i) por contribuir com o avanço no entendimento da importância de se utilizar DRM em estágios precoces da indução, especificamente no D8, e (ii) como consequência, por levar à implantação da pesquisa de DRM na FHMOAM, proporcionando uma melhor avaliação da resposta ao tratamento e manejo terapêutico por método mais acurado.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a aplicação da DRM na estratificação de risco de recaída em crianças portadoras de LLA tratadas pelo protocolo GBTLI-2009

3.2 Específicos

- Analisar a correlação entre DRM no D8, D15 e D35 com sua respectiva contagem manual de blastos
- Analisar a associação entre DRM no D8, D15 e D35 com parâmetros clínicos e laboratoriais de risco de recaída do GBTLI-2009
- Avaliar o potencial impacto da DRM no D8 como parâmetro de estratificação de risco

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo do estudo

Estudo descritivo do tipo inquérito.

4.2 Universo do estudo

4.2.1 População de referência

Crianças com leucemia que habitam o Estado do Amazonas, região norte do Brasil, sendo a segunda unidade federativa mais populosa desta macrorregião, com 3,8 milhões de habitantes. A capital, Manaus, concentra 2 milhões de habitantes, mais de 50% da população do Estado ⁽⁴³⁾.

4.2.2 População de Estudo

Crianças com LLA *de novo* atendidas na FHEMOAM.

4.2.3 Critérios de inclusão

- Crianças de 0-18 anos
- Casos de LLA B *de novo*, recém diagnosticados, que iniciarão a fase de indução quimioterápica, conforme o protocolo GBTLI-2009
- Aceite do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) pelo responsável legal da criança ou adolescente

4.2.4 Critérios de exclusão

- Materiais biológicos insuficientes, coagulados, mal conservados ou com contaminação
- Violação do protocolo de tratamento por qualquer motivo

4.2.5 Cálculo da amostra

O tamanho da amostra foi calculado com base na seguinte equação matemática: $n = Z^2 \cdot P \cdot Q / d^2$, onde P é a prevalência de positividade da DRM; (Q é o complemento para 100%); Z é a variável reduzida para um alfa de 5% (que é igual a 1,96); d é o nível de precisão utilizado que foi igual a 10% ⁽³⁵⁾. A prevalência de positividade da CF-DRM foi estimada em 87,3% para o D15 em crianças tratadas com o protocolo GBTLI-2009 ⁽³⁸⁾. Obteve-se como resultado 40 participantes. A amostra foi obtida por conveniência do período de janeiro de 2014 a janeiro de 2015. Todos os pacientes diagnosticados no período preencheram os critérios de inclusão, totalizando quarenta pacientes.

4.2.6 Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da FHEMOAM, com o número CAAE: 9189013.7.0000.0009

4.3 Pacientes

Os dados clínicos dos pacientes foram coletados através do preenchimento de ficha clínica (anexo 9.2) composta por identificação, idade, peso, altura, superfície corporal, gênero, aspectos sociodemográficos, características citomorfológicas, classificação da leucemia por imunofenotipagem, grupo de risco e grau de resposta à terapia indutória por citologia convencional e DRM. Essas informações foram armazenadas em fichas individuais com acesso controlado e restrito aos profissionais da pesquisa. Os pacientes foram classificados em baixo ou alto risco com base nas normas do GBTLI-2009 (quadro 4).

4.4 Coleta dos materiais biológicos

A coleta dos materiais biológicos ocorreu mediante aprovação do CEP. Os responsáveis legais dos pacientes assinaram TCLE (anexo 9.1), após receberem

instruções quanto ao objetivo da pesquisa que foram fornecidas pelo profissional coordenador do projeto ao diagnóstico. O anexo 9.3 apresenta o fluxograma da coleta dos materiais biológicos e o anexo 9.4, a sistematização das etapas do estudo.

4.4.1 Sangue periférico

Foram coletadas amostras de SP por profissional enfermeiro capacitado, ao diagnóstico e no D8 conforme a técnica descrita no anexo 9.5 ⁽⁷²⁾. O SP foi coletado em seringa de 5mL sem anticoagulante e foram realizados três esfregaços para análise morfológica. Os esfregaços foram devidamente identificados com as iniciais do paciente e data da coleta e acondicionados em cartela própria em temperatura ambiente. Paralelamente, 4mL de SP foram armazenados em tubos com anticoagulante EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) e identificados com o nome completo do paciente e data da coleta, acondicionados em isopor na temperatura ambiente e transportados, juntamente com os esfregaços, imediatamente após a coleta, sob responsabilidade do técnico de enfermagem, ao laboratório de marcadores celulares da FHEMOAM.

4.4.2 Aspirado medular

Foram coletados aspirados de MO por profissional médico hematologista pediátrico ao diagnóstico, D15 e D35 da terapia de indução. Na dependência das condições clínicas dos pacientes e da idade (crianças abaixo de 10 anos), receberam sedação com anestésico inalatório (sevoflurano® inalatório) sob supervisão de um profissional médico anestesista. O local de escolha para a obtenção de MO em crianças com idade superior a 12 meses foi a crista ilíaca posterior por conter a maior quantidade de medula celular nessa idade e inexistirem órgãos vitais em estreita proximidade. Para crianças com idade inferior a 12 meses a coleta foi realizada no platô tibial pela facilidade de acesso dessa topografia. A técnica da coleta está descrita no anexo 9.5 ⁽¹⁾. Foram coletados inicialmente 0,5mL de aspirado medular em seringa de 5mL sem anticoagulante,

destinados ao preparo de quatro esfregaços para análise morfológica. Os esfregaços foram devidamente identificados com as iniciais do paciente e data da coleta e acondicionados em cartela própria em temperatura ambiente. A seguir, foram aspirados mais 5 mL de MO, sendo que, 2mL foram aspirados em seringa de 5mL com EDTA e transferidos para tubos com EDTA destinados a imunofenotipagem e, 3mL foram aspirados em seringa de 5mL heparinizadas e transferidos para tubos de heparina para análise citogenética. No D15 e D35 não foi coletado material para citogenética. Todo o material (tubos e cartela com esfregaços), devidamente identificado, foi acondicionado em caixa de isopor em temperatura ambiente e transportado, imediatamente após a coleta, sob responsabilidade do técnico de enfermagem, ao laboratório de marcadores celulares FHEMOAM.

4.4.3 Punção lombar

A punção lombar foi realizada ao diagnóstico por profissional médico anestesista, com intuito de realizar pesquisa de blastos no líquido⁽⁶⁹⁾. Foi coletado 2mL de líquido pela técnica da punção lombar descrita no anexo 9.5⁽²²⁾.

4.5 Processamento e análise dos materiais biológicos

4.5.1 Esfregaços de SP e MO

A coloração dos esfregaços de SP e MO foi realizada pelo método convencional de May-Grünwald-Giemsa (MGG). O anexo 9.6 descreve o procedimento técnico⁽⁴⁵⁾. A análise morfológica dos esfregaços de SP foi realizada por médico hematologista pediátrico, sendo contabilizados os blastos em 100 células ao diagnóstico e no D8 para estratificação de risco. Na MO, blastos foram contabilizados a cada 300 células ao diagnóstico (definindo leucemia aguda, segundo WHO, se contagem >25%) e nos D15 e D35, a fim de estadiar a medula. (M₁:<5% de blastos; M₂:5-25% blastos e M₃:>25% blastos) (quadro 4)⁽⁶⁹⁾.

4.5.2 Amostras de SP e MO colhidas em EDTA

A amostra de SP coletada em EDTA no diagnóstico e D8 foi submetida à análise automatizada de células, utilizando a plataforma ADIVIA®2120i, que fornece o número absoluto de leucócitos da amostra a fim de estratificar o paciente segundo o protocolo GBTLI-2009 (quadro 4). Ademais, a amostra de SP coletada em EDTA no D8 foi encaminhada para detecção de CF-DRM.

As amostras de MO coletadas em EDTA ao diagnóstico foram encaminhadas para realização de imunofenotipagem a fim de classificar a linhagem celular segundo a WHO e identificar o fenótipo anômalo associado a leucemia e, nos D15 e D35, para detecção de CF-DRM.

4.5.2.1 Imunofenotipagem ao diagnóstico de amostras de MO colhidas em EDTA

A imunofenotipagem foi realizada por meio de AcMo marcados com fluorocromos, que reconhecem epítomos específicos de antígenos celulares presentes na superfície, citoplasma e núcleo das células, conforme implementado em citômetro de fluxo *FACSCalibur Becton-Dickinson* ⁽⁵⁹⁾. Os fluorocromos utilizados foram o isotiocianeto de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC) e proteína clorofila peridina (Percp) que, excitados pelo laser do citômetro, emitem luz com diferentes comprimentos de onda. A luz refratada é captada por receptores e estes dados celulares (eventos) foram processados e adquiridos em gráficos ou *dotplots*, divididos em parâmetros de fluorescência (FL1, FL2, FL3 e FL4) e parâmetros de dispersão da luz que refletem o tamanho celular e complexidade interna (FSC- *forward scatter* SSC- *side scatter* respectivamente), possibilitando análise de populações celulares específicas via *software cell quest* (figura 5). A população celular de interesse (blastos) apresenta pequeno tamanho e baixa complexidade e foi selecionada para estudo por meio de um traçado conhecido como *gate* (figura 6) ^(33,59).

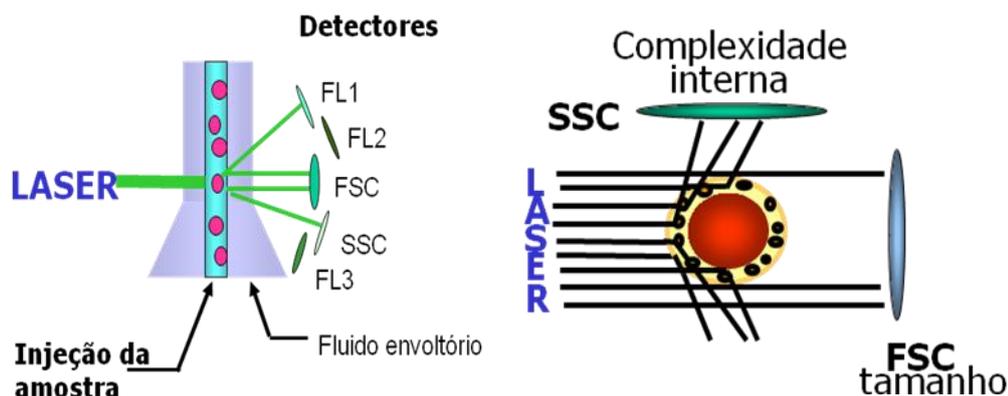


Figura 5 - Representação esquemática da citometria de fluxo. FL: parâmetro de fluorescência; FSC: *forward scatter*; SSC: *side scatter*
(Fleury,2012)

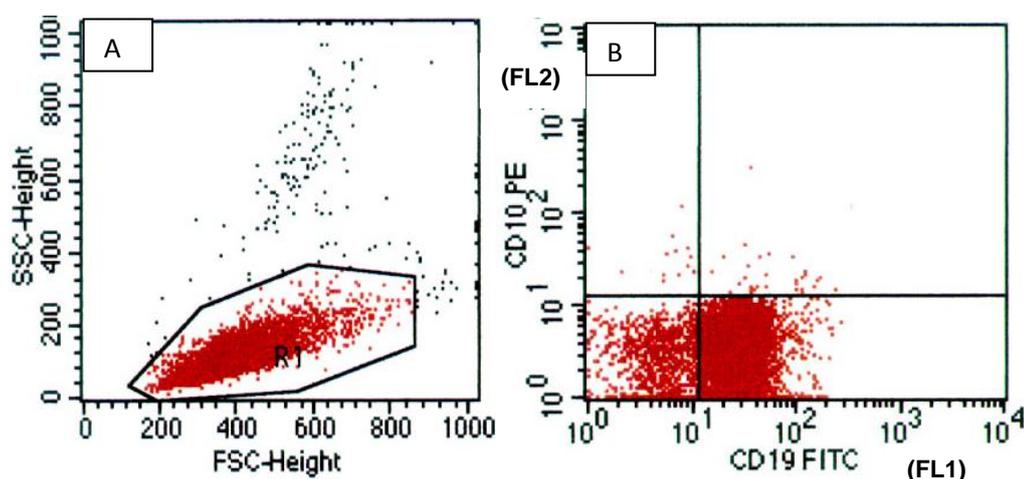


Figura 6- Representação gráfica da aquisição em citometria de fluxo.
A: representação do gráfico de tamanho (FSC) x complexidade (SSC), com a região de blastos em destaque (R1); B: representação do gráfico (FL1) x (FL2) com os marcadores CD10 negativo e CD19 positivo. O marcador é considerado positivo quando os eventos encontram-se acima de 10^1
(Fleury,2012)

Neste estudo, todo processamento das amostras para marcação celular por imunofenotipagem dos antígenos de superfície celular, citoplasmáticos e nucleares seguiu o procedimento técnico descrito no anexo 9.7 ⁽⁴⁵⁾. Com o objetivo de garantir qualidade, o CF foi calibrado através dos beads de calibração e das configurações do instrumento de análise (*instruments settings*) e os reagentes foram adequadamente processados conforme anexo 9.7 ^(15,59).

Ao diagnóstico, conforme anexo 9.7, a amostra foi submetida a um amplo painel de AcMo (*Flow Cytometry Kits BD*) de triagem para determinar a linhagem da população celular de blastos, promovendo o diagnóstico diferencial entre LLA B, LLA T e Leucemia Mielóide Aguda (LMA). O painel contempla marcadores de linhagem linfóide B (CD79, CD19, cIgM) e T (cCD3, CD7) bem como linhagem mielóide (MPO, CD13). O CD45, também presente no painel, é um marcador pan-leucocitário fracamente expresso nos blastos, enquanto o CD34 é um marcador de imaturidade, comumente presente nos blastos ^(15,34). Para controle de qualidade do painel, foi realizado um tubo controle negativo e em todos os tubos foi acrescentando o isotipo controle IgG1 capaz de identificar reações antígeno-anticorpo inespecíficas ^(15,34).

Nos casos em que o painel de triagem evidenciou LLA B, foi realizado um painel complementar para sua respectiva subclassificação e determinação do fenótipo anômalo associado a leucemia, que foi utilizado no monitoramento da DRM. Foram testados individualmente cada marcador anômalo (quadro 6) e pesquisada sua expressão. Inicialmente, foram adquiridos 10.000 eventos e, nos tubos com marcadores anômalos positivos, foram acrescentados os marcadores CD10, CD34 e CD19 e, exclusivamente para estes tubos, foi realizada nova aquisição sobrepondo a aquisição realizada isoladamente (anexo 9.7) ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾.

4.5.2.2 Pesquisa de DRM em amostras de MO (D15) e SP (D8) colhidas em EDTA

Nessas fases do tratamento, hematogônias são ausentes permitindo a utilização de painéis de anticorpos simplificados para pesquisar DRM. A inclusão do Syto 13, marcador celular de viabilidade, permitiu excluir células apoptóticas da análise permitindo que a DRM fosse mensurada apenas no conjunto de células viáveis. Isotipo controle IgG 1 foi incluído com o objetivo de identificar reações antígeno-anticorpo inespecíficas ^(15,34). Para detecção da DRM no D8 e D15 na LLA B, conforme anexo 9.7, foi realizado um painel simplificado que pesquisa a combinação simultânea de CD10/CD19/CD34 como marcadores de DRM já que não estão presentes simultaneamente na linfopoese normal. Visando garantir a

qualidade da CF-DRM, foram prevenidos artefatos técnicos geradores de resultados falso-positivos e falso-negativos, conforme anexo 9.7 ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾.

4.5.2.3 DRM de amostras de MO (D35) colhidas em EDTA

Nessa fase do tratamento, a MO está em recuperação com uma porcentagem significativa de hematogônias, portanto, painéis mais robustos são necessários para pesquisar DRM ⁽¹⁵⁾. Para detecção da DRM no D35 na LLA B foi realizado o procedimento descrito no anexo 9.7. O marcador anômalo presente ao diagnóstico foi pesquisado como marcador de DRM utilizando uma máscara previamente padronizada com o perfil de fluorescência dos marcadores anômalos na MO normal para análise dos dados ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾.

4.5.3 Amostras MO colhidas em heparina

As amostras coletadas em heparina foram destinadas a análise citogenética que foi realizada a partir de cultura de células da MO. As células foram submetidas à ação da enzima tripsina, que desnatura as proteínas cromossômicas, sendo incubadas a 37 °C, coradas posteriormente com *Giemsa* e as imagens obtidas através da microscopia foram capturadas pelo *software Cytovision*, com resultados expressos de acordo com as recomendações do ISCN (*Cytogenetic Nomenclature*). A técnica está descrita no anexo 9.6 ^(30,48,73).

4.5.4 Liquor

A amostra de liquor foi encaminhada para contagem global de leucócitos e hemácias realizada em câmara de *Fuchs-Rosenthal*. Para exame morfológico, 200µL da amostra foram colocados em centrifuga modelo CT12 e centrifugados a 400 rpm por 4 minutos. O citospin resultante foi corado por MGG e realizado exame morfológico para contagem manual de blastos ⁽²²⁾.

4.6 Análise Estatística

Foram estimadas as frequências absolutas simples e relativas para os dados categóricos e média e desvio-padrão (Dp) para os dados quantitativos. No caso da rejeição da hipótese de normalidade por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, foi calculada a mediana para os dados quantitativos. Na comparação dos dados categóricos foi aplicado o teste estatístico exato de *Fisher*. Na comparação das médias foram aplicados os testes *t-student* e Análise de Variância - ANOVA^(3,74). Para análise de correlação entre DRM e contagem manual de blastos foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Foram incluídos no cálculo de coeficiente de correlação apenas os valores acima limite de sensibilidade da técnica morfológica, a saber: 5%. O nível de significância dos testes estatísticos foi de 5%^(3,74). Os *software* utilizado na análise dos dados foram o programa Epi-Info versão 7.1.4 para *windows*, que é desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo CDC (www.cdc.org/epiinfo), e o programa *GraphPad Prism* v 5.0.

5 RESULTADOS

No período de janeiro de 2014 até janeiro de 2015 foram inseridos no estudo 40 pacientes com idade entre 1-17 anos, diagnosticados com LLA B *de novo*. As características sociodemográficas da amostra estudada estão descritas na tabela 1. Há um discreto predomínio do gênero masculino comparado ao feminino (1,3:1) com mediana de 3,5 anos de idade ao diagnóstico. Houve ligeiro predomínio nas crianças de cor não branca comparado as de cor branca (1,3:1). A maior parcela da casuística foi composta por crianças naturais e procedentes de Manaus (67,5%), em comparação com 32,5% dos demais municípios do Amazonas. O grau de escolaridade materna foi bastante heterogêneo, já que 50% das mães apresentaram ensino médio completo e os 50% restantes estavam distribuídas entre as categorias: não alfabetizada (7,5%), fundamental incompleto (25%), fundamental completo (7,5%) e médio incompleto (10%). A renda familiar mensal variou entre 0-4 salários mínimos, com mediana de dois salários mínimos.

A tabela 2 descreve características clínicas e laboratoriais da amostra. Observa-se que, ao diagnóstico, 50 a 55% das crianças apresentaram organomegalia (hepatomegalia e/ou esplenomegalia) e 42,5%, adenomegalias. No hemograma inicial, a série vermelha apresentou média de hematócrito de $25,2\% \pm 4,9$ e média de hemoglobina de $8,3\text{g/dL} \pm 1,7$. A série plaquetária apresentou mediana de 38.500 plaquetas/ mm^3 e, a série branca, mediana de 9.485 leucócitos/ mm^3 . Ao diagnóstico, 80% dos pacientes apresentaram leucometria abaixo de 50.000 leucócitos/ mm^3 versus 20% com leucometria acima de 50.000 . A pesquisa de blastos no líquido foi positiva em 5% dos pacientes e 95% não apresentaram infiltração em SNC. LLA B comum foi o imunofenótipo de 100% dos pacientes, dos quais, 87,5% apresentaram fenótipo anômalo para pesquisa de CF-DRM. Entre eles, 57,1% tinham padrão anômalo por intensidade de fluorescência (CD58 forte; CD45 negativo e CD38 fraco) e 42,9% por infidelidade de linhagem (CD66c positivo e CD33 positivo). Ademais, a tabela 2 expressa os resultados da avaliação citogenética, limitados pela ausência de metáfase em 40% da amostra. Entre os pacientes com metáfase presente, 70,8%

apresentaram cariótipo normal. A hiperploídia, alteração de bom prognóstico, foi observada em 20,8% e 8,4% apresentaram t(9;22), de mau prognóstico.

Tabela 1. Distribuição segundo a frequência do perfil socioeconômico, etário, cor, gênero, naturalidade e procedência das crianças portadoras de LLA, Manaus - AM.

Variáveis (n = 40)	f _i	%
Gênero		
Feminino	17	42,5
Masculino	23	57,5
Idade		
< 9 anos	30	75,0
≥ 9 anos	10	25,0
Mediana	3,5	
Raça/Cor		
Branca	17	42,5
Não branca	23	57,5
Naturalidade		
Manaus	27	67,5
Demais municípios do Amazonas	13	32,5
Procedência		
Manaus	27	67,5
Demais municípios do Amazonas	13	32,5
Escolaridade da Mãe		
Não alfabetizada	3	7,5
Fundamental incompleto	10	25,0
Fundamental completo	3	7,5
Médio incompleto	4	10,0
Médio completo	20	50,0
Renda familiar (Salários Mínimos)		
0 --- 1	12	30,0
1 --- 2	14	35,0
2 --- 3	21	52,5
3 --- 4	3	7,5
Mediana	2,0	

f_i = frequência absoluta simples.

Tabela 2. Distribuição segundo a frequência das características clínicas e laboratoriais das crianças portadoras de LLA, Manaus - AM.

Variáveis (n = 40)	f _i	%
Hepatomegalia	22	55,0
Esplenomegalia	20	50,0
Adenomegalia	17	42,5
Leucócitos iniciais		
< 50.000 leucócitos/mm ³	32	80,0
≥ 50.000 leucócitos/mm ³	8	20,0
Mediana	9.485	
HTC (%)		
Média ± Dp	25,2 ± 4,9	
HB		
Média ± Dp	8,3 ± 1,7	
PLT		
Mediana	38.500	
Líquor		
Alterado	2	5,0
Normal	38	95,0
Imunofenótipo		
LLA B comum	40	100,0
Fenótipo anômalo		
Ausente	5	12,5
Presente	35	87,5
CD58 forte	15/35	42,9
CD66c positivo	13/35	37,2
CD45 negativo	4/35	11,4
CD33 positivo	2/35	5,7
CD38 fraco	1/35	2,8
Citogenética		
Metáfase ausente	16	40,0
Metáfase presente	24	60,0
Hiperploida	5/24	20,8
t(9;22)	2/24	8,4
Sem alterações	17/24	70,8

f_i = frequência absoluta simples.

A tabela 3 retrata a estratificação de risco de recaída ao diagnóstico, utilizando os critérios do protocolo GBTLI, com suas variáveis. Destaca-se que 31,25% dos pacientes apresentaram de forma combinada duas ou mais variáveis definidoras de alto risco.

Tabela 3. Distribuição segundo a frequência da estratificação de risco de recaída ao diagnóstico das crianças portadoras de LLA, Manaus - AM.

Variáveis (n = 40)	f _i	%
Diagnóstico		
Baixo Risco (BR)	24	60,00
Alto Risco (AR)	16	40,00
Idade	7/16	43,75
Leucócitos	4/16	25,00
Idade + Citogenética	1/16	6,25
Idade + Leucócitos	1/16	6,25
Leucócitos + Líquor	1/16	6,25
Leucócitos + Citogenética	1/16	6,25
Idade+ Leucócitos + Líquor	1/16	6,25

f_i = frequência absoluta simples

Todos os pacientes foram avaliados quanto a presença de fenótipo anômalo associado a leucemia. Entre eles, 35 (87,5%) apresentaram fenótipo anômalo ao diagnóstico. No D8, dos 40 pacientes, 35 (87,5%) foram avaliados com pesquisa de CF-DRM e contagem manual de blastos, enquanto 5 pacientes (12,5%) tiveram amostras insuficientes para pesquisa de CF-DRM, sendo avaliados apenas pela contagem manual de blastos nesse momento. No D15, os 40 pacientes (100%) foram avaliados com pesquisa de CF-DRM e contagem manual de blastos. No intervalo entre D15 e D35 ocorreram 6 óbitos (15%), sendo possível o seguimento de 34 pacientes (85%) da amostra inicial. No D35, dos 34 pacientes, 29 (85,3%) foram avaliados com pesquisa de CF-DRM e contagem manual de blastos, enquanto 5 (14,7%) foram avaliados apenas com contagem manual de blastos, devido a ausência de fenótipo anômalo para pesquisa de CF-DRM. A figura 7 sintetiza esquematicamente essas etapas com os seus resultados .

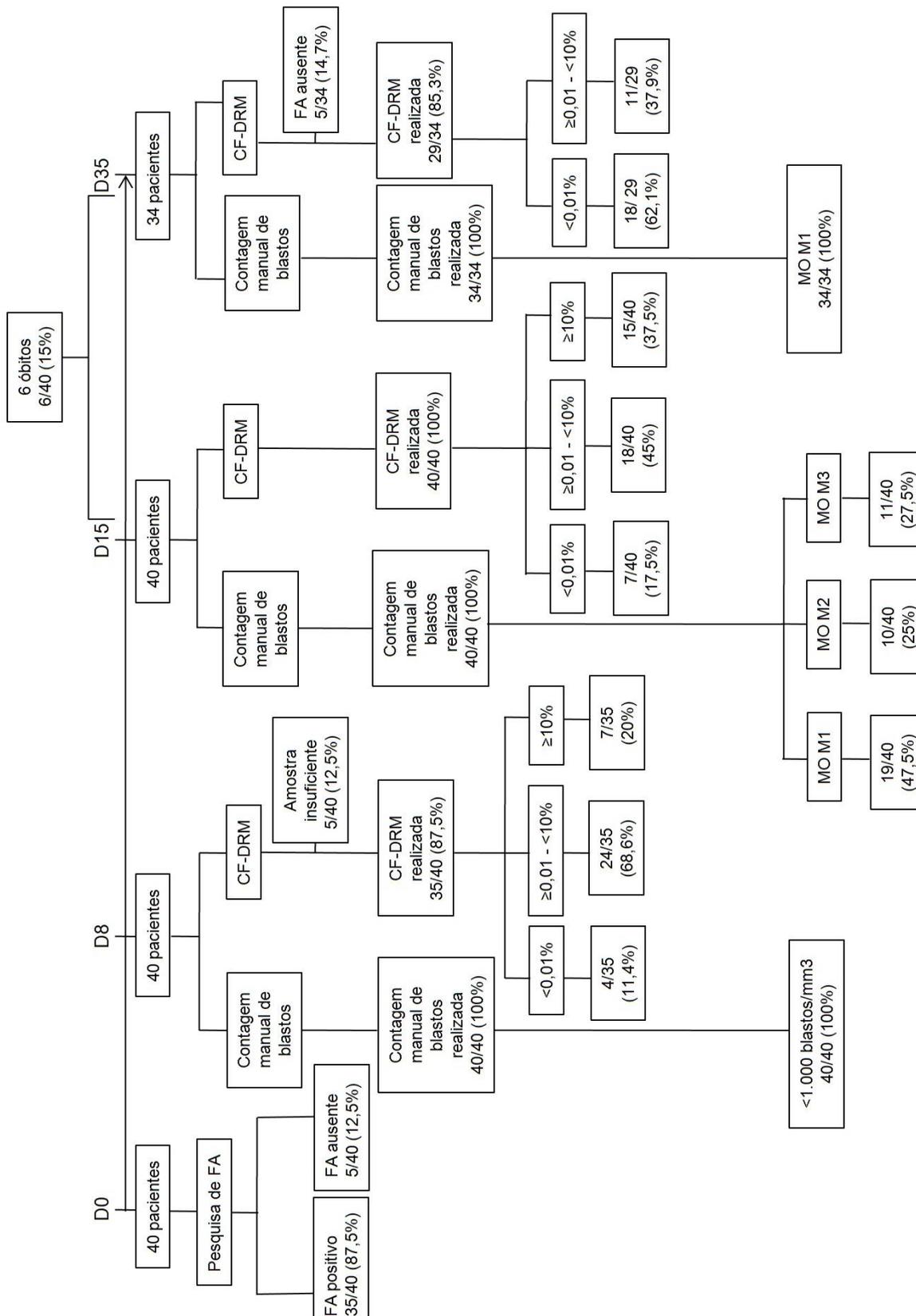


Figura 7- Fluxograma dos pacientes durante a terapia de indução

A figura 8 expressa a comparação entre a contagem manual de blastos e o resultado da CF-DRM para D8, D15 e D35. No D8, dos 40 pacientes, 35 (87,5%) foram avaliados com pesquisa de CF-DRM e 5 pacientes (12,5%) tiveram amostras insuficientes para essa metodologia de análise. Surpreendentemente, apesar de todos os pacientes apresentarem <1.000 blastos/ mm^3 pela contagem manual, os níveis de DRM no D8 foram muito variados: mais da metade dos pacientes (68,6%) apresentaram níveis intermediários de DRM ($\geq 0,01$ - $<10\%$); 20% altos níveis ($\geq 10\%$) e 11,4% DRM negativa ($\leq 0,01\%$). No D15, ressalta-se que aproximadamente metade dos pacientes apresentaram MO M₁ (47,5%) enquanto os demais apresentaram percentual de distribuição semelhante para medula MO M₂ (25%) e MO M₃ (27,5%). Entre os pacientes classificados como MO M₁ no D15, 68,4% ainda apresentaram DRM em níveis intermediários e 31,6% apresentaram DRM negativa. Entre os pacientes MO M₂ no D15, a distribuição do resultado da DRM foi mais heterogênea, com 60% dos pacientes apresentando DRM em níveis intermediários e 40% altos níveis. No caso dos pacientes classificados como MO M₃ no D15, 100% apresentaram DRM em altos níveis. No período entre D15 e D35 ocorreram seis óbitos com maior frequência proporcional no grupo MO M₃ (18%), seguido de MO M₁ (15,8%) e MO M₂ (10%). Todos os 34 pacientes sobreviventes apresentaram MO M₁ no D35, porém, 5 pacientes (14,7%) não puderam ser avaliados por CF-DRM nesse momento, devido ausência de fenótipo anômalo. Entre os 29 pacientes avaliados pelas duas metodologias no D35, 62,1% apresentaram DRM negativa e 37,9% ainda apresentaram DRM em níveis intermediários, apesar da completa remissão morfológica.

A figura 9 sintetiza a distribuição segundo a frequência de DRM no D8, D15 e D35. As figuras 10, 11 e 12 retratam a correlação entre o resultado da CF-DRM e sua respectiva contagem manual de blastos. Note correlação satisfatória nas amostras com mais de 5% de linfoblastos detectáveis na contagem manual. Discrepâncias entre avaliação morfológica e CF-DRM ocorreram em amostras contendo 1-5% de linfoblastos na contagem manual.

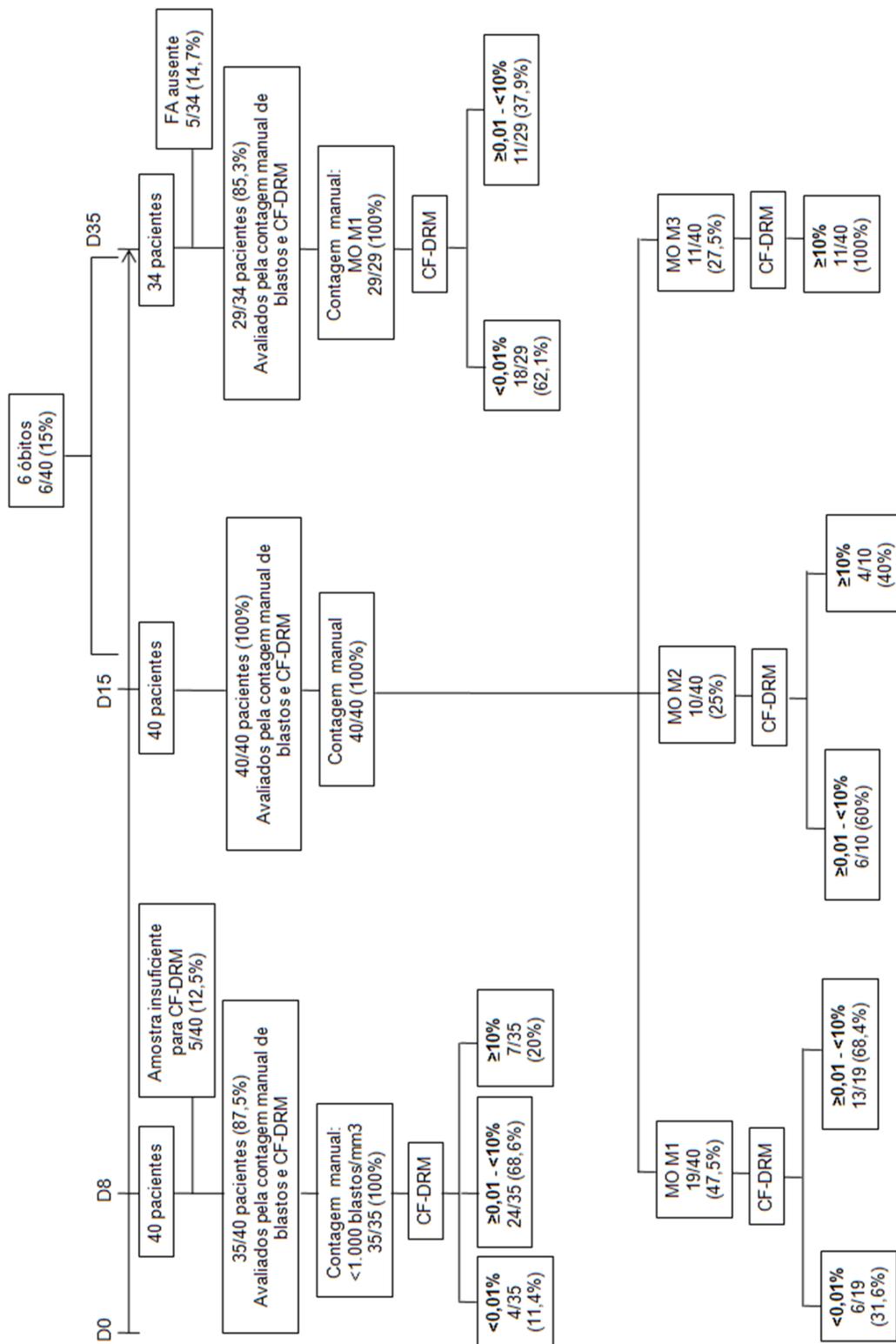


Figura 8- Fluxograma da contagem manual de blastos e CF-DRM

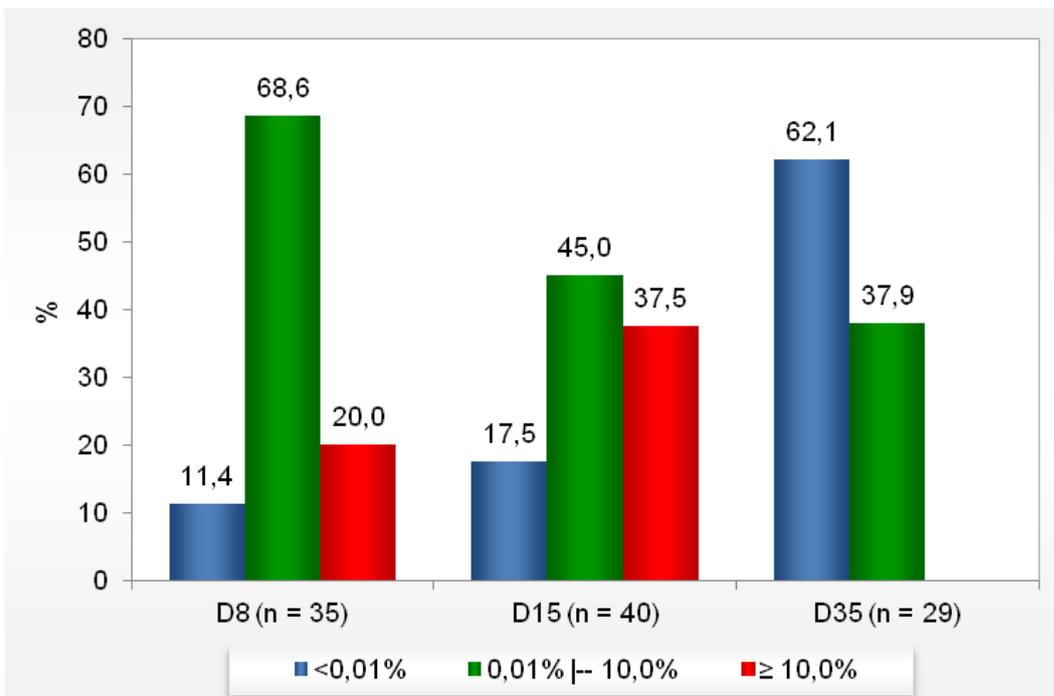


Figura 9- Distribuição segundo a frequência do DRM no D8, D15 e D35

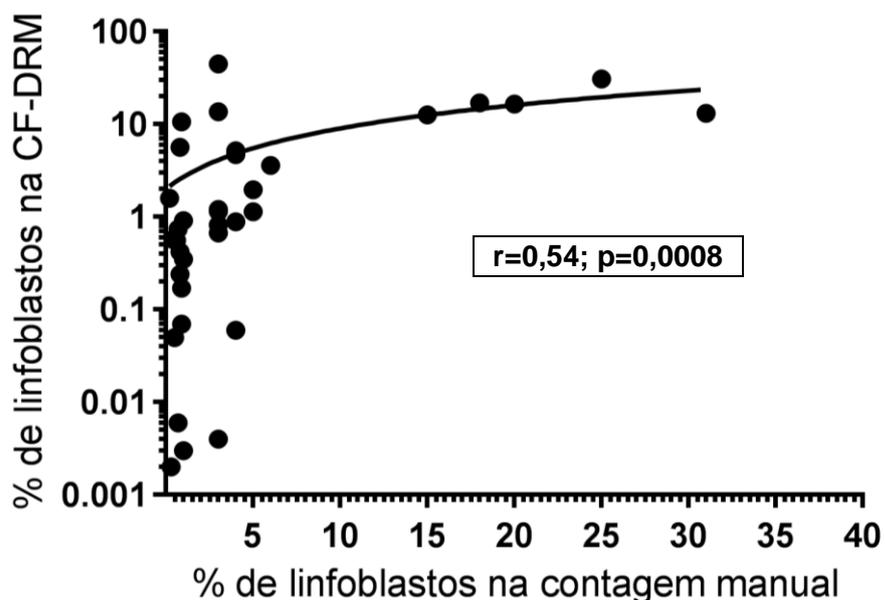


Figura 10- Correlação entre contagem manual de blastos e CF-DRM no D8. Coeficiente de correlação (r) de Pearson com os dados de amostras com % de blastos na contagem manual acima de 5%.

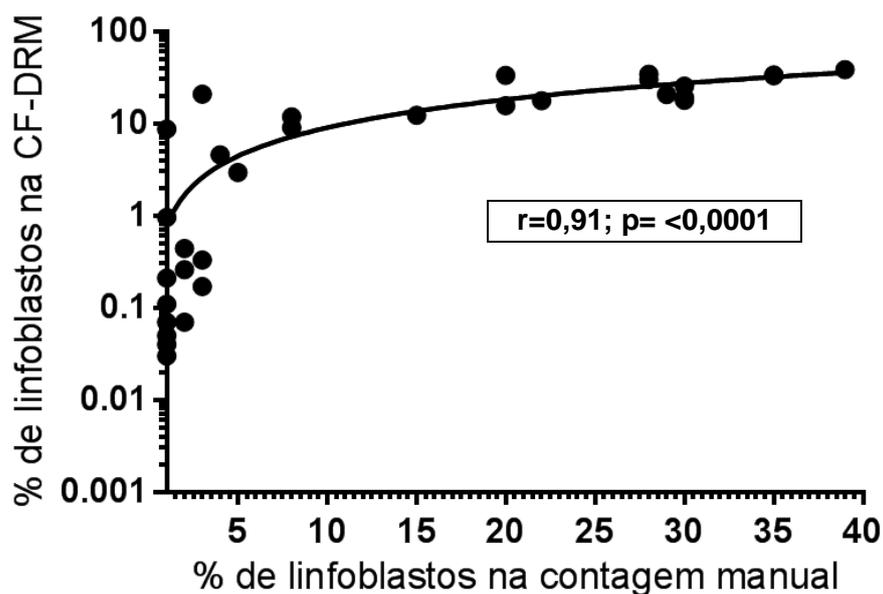


Figura 11- Correlação entre contagem manual de blastos e CF-DRM no D15. Coeficiente de correlação (r) de Pearson com os dados de amostras com % de blastos na contagem manual acima de 5%.

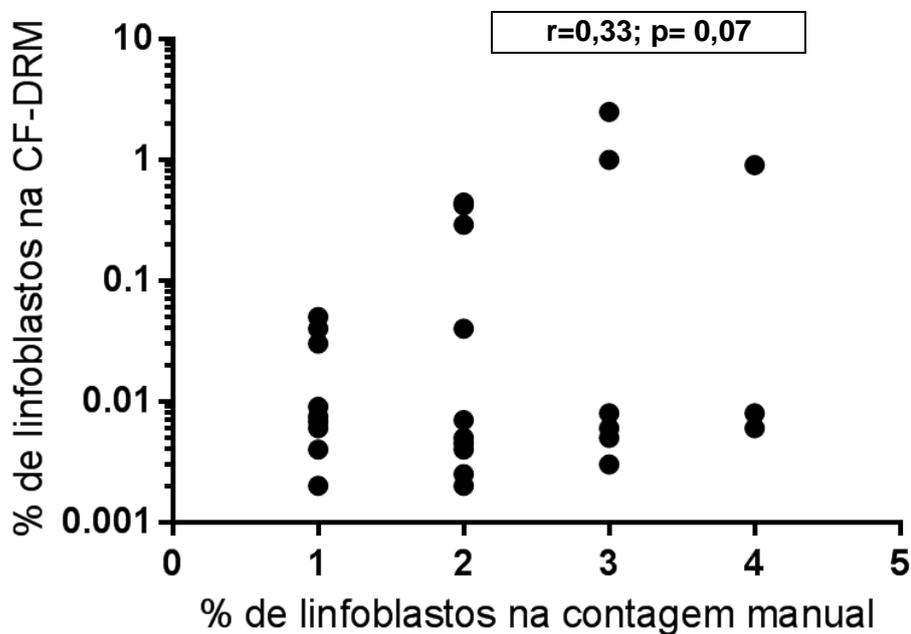


Figura 12- Correlação entre contagem manual de blastos e CF-DRM no D35. Coeficiente de correlação (r) de Pearson com os dados de amostras com % de blastos na contagem manual abaixo de 5%.

As figuras 13 e 14 retratam a aplicação desses resultados na re-estratificação de risco, conforme GBTLI-2009. Nota-se, na figura 13, que todos os pacientes inicialmente classificados como baixo risco foram re-estratificados no D8 em respondedores rápidos, por apresentarem contagem manual de blastos em SP <1.000 blastos/mm³. No D15, somando o percentual de pacientes MO M₁ (41,6%) e MO M₂ (33,4%), observamos que, em 75% dos pacientes, a real re-estratificação de risco só foi possível com base na associação dos resultados da contagem manual de blastos e CF-DRM. Observa-se que 80% dos pacientes MO M₁ apresentaram níveis intermediários de DRM, sendo re-estratificados em baixo risco intermediário, e apenas 20% apresentou DRM negativa, sendo re-estratificados em baixo risco verdadeiro. Ademais, apesar de 37,5% dos pacientes apresentarem MO M₂ no D15, os níveis de DRM nesses pacientes foram $\geq 10\%$, modificando sua estratificação de risco para alto risco respondedor lento. Os 62,5% restantes dos pacientes MO M₂ apresentaram níveis intermediários de DRM, mantendo-se no grupo baixo risco, porém, sendo re-estratificados em baixo risco intermediário. No que tange aos pacientes MO M₃ no D15, todos apresentaram DRM em níveis $\geq 10\%$, sendo re-estratificados em alto risco respondedor lento. No período entre D15 e D35, dois óbitos ocorreram no grupo de pacientes que foram re-estratificados como baixo risco intermediário e três óbitos no grupo de pacientes re-estratificados como alto risco respondedor lento. No D35 todos os sobreviventes evoluíram para completa remissão morfológica (MO M₁), mantendo suas re-estratificações de risco.

Na figura 14, observa-se que todos os pacientes inicialmente classificados como alto risco foram re-estratificados no D8 em respondedores rápidos, por apresentarem contagem manual de blastos em SP <1.000 blastos/mm³. No D15, somando o percentual de pacientes MO M₁ (56,2%) e MO M₂ (12,5%), observamos que, em 68,7% dos pacientes, a real re-estratificação de risco só foi possível com base na associação dos resultados da contagem manual de blastos e CF-DRM. Observa-se que 55,5% dos pacientes MO M₁ apresentaram níveis intermediários de DRM, sendo re-estratificados em alto risco respondedor rápido, e 44,5% apresentou DRM negativa, sendo também re-estratificados em alto risco respondedor rápido. Ademais, apesar de 50% dos pacientes apresentarem MO

M₂ no D15, os níveis de DRM nesses pacientes foram $\geq 10\%$, modificando sua estratificação de risco para alto risco respondedor lento. Os 50% restantes dos pacientes MO M₂ apresentaram níveis intermediários de DRM mantendo-se no grupo alto risco, porém, sendo re-estratificados em alto risco respondedor lento. No que tange aos pacientes MO M₃ no D15, todos apresentaram DRM em níveis $\geq 10\%$ sendo re-estratificados em alto risco respondedor lento. No período entre D15 e D35 um óbito ocorreu no grupo de pacientes que foi re-estratificado como alto risco respondedor rápido. No D35 todos os sobreviventes evoluíram para completa remissão morfológica (MO M₁), mantendo suas re-estratificações de risco.

Com o objetivo de detalhar o comportamento dos diferentes níveis de DRM durante a terapia de indução, a figura 15 esquematiza o seguimento dos pacientes descrevendo, isoladamente, o resultado da CF-DRM. Os pacientes que no D8 apresentaram DRM negativa evoluíram no D15 e D35 com manutenção da DRM negativa. O seguimento da parcela de pacientes com níveis intermediários de DRM no D8 revelou que, no D15, 50% mantinha DRM em níveis intermediários; 37,5% em altos níveis e, em apenas 12,5%, a DRM foi negativa. Para os pacientes com altos níveis de DRM no D8, 71,4% mantiveram altos níveis no D15; 28,5% níveis intermediários e nenhum paciente apresentou DRM negativa no D15.

As figuras 16 e 17 avaliam o potencial impacto da CF-DRM no D8 como parâmetro precoce de estratificação de risco para pacientes inicialmente baixo e alto risco, respectivamente. A análise teve como princípio a comparação entre os níveis de CF-DRM no D8 com os grupos de risco do D15.

Nota-se, na figura 16, que todos os pacientes re-estratificados no D15 em baixo risco intermediário (BRI) e alto risco (AR) apresentaram CF-DRM positiva no D8. Uma limitação desta análise foi o baixo número de indivíduos classificados como baixo risco verdadeiro ($n = 2$), que limitou o poder estatístico. A expansão deste número é fundamental para se confirmar o efeito observado.

Na figura 17, observe que todos os pacientes re-estratificados no D15 em respondedores rápidos apresentaram no D8 CF-DRM em níveis $<1\%$, enquanto que, pacientes re-estratificados no D15 em respondedores lentos apresentaram níveis de CF-DRM $\geq 1\%$ no D8.

A tabela 4 analisa a associação do resultado da CF-DRM no D8, D15 e D35 com parâmetros clínicos e laboratoriais do diagnóstico. Note que essa análise explorou a ocorrência de diferença estatística ao nível de 5% de significância entre os parâmetros descritos e a positividade ($\geq 0,01\%$) ou negatividade ($< 0,01\%$) da DRM. Observe que, em nossa casuística, houve diferença estatística apenas para leucometria e resultado da DRM no D8 e D15. Curiosamente, pacientes com leucometria inicial menor que 50.000 leucócitos/mm³ apresentaram maior frequência de DRM positiva no D8 e D15.

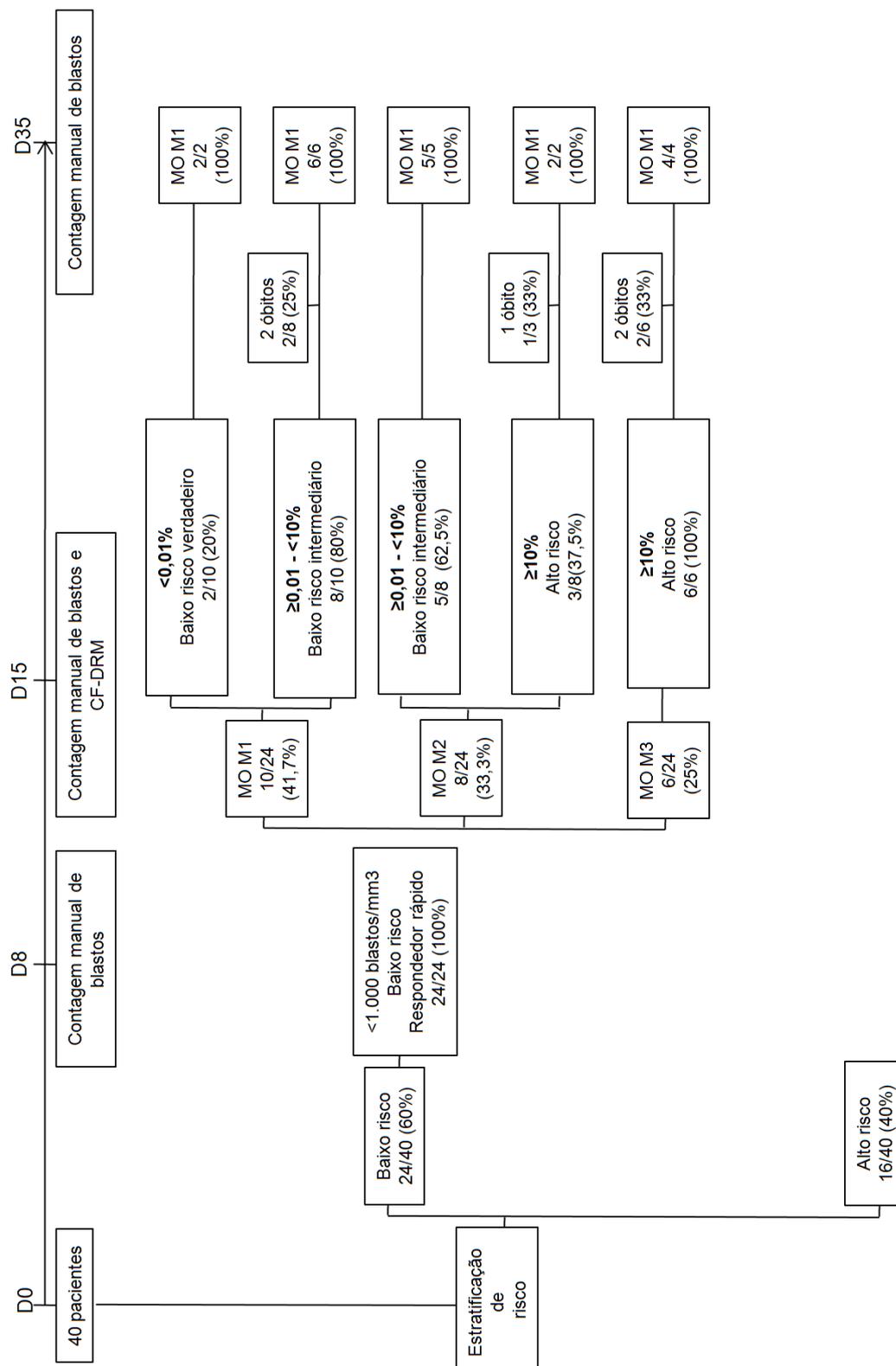


Figura 13- Fluxograma da re-estratificação de risco (Baixo Risco)

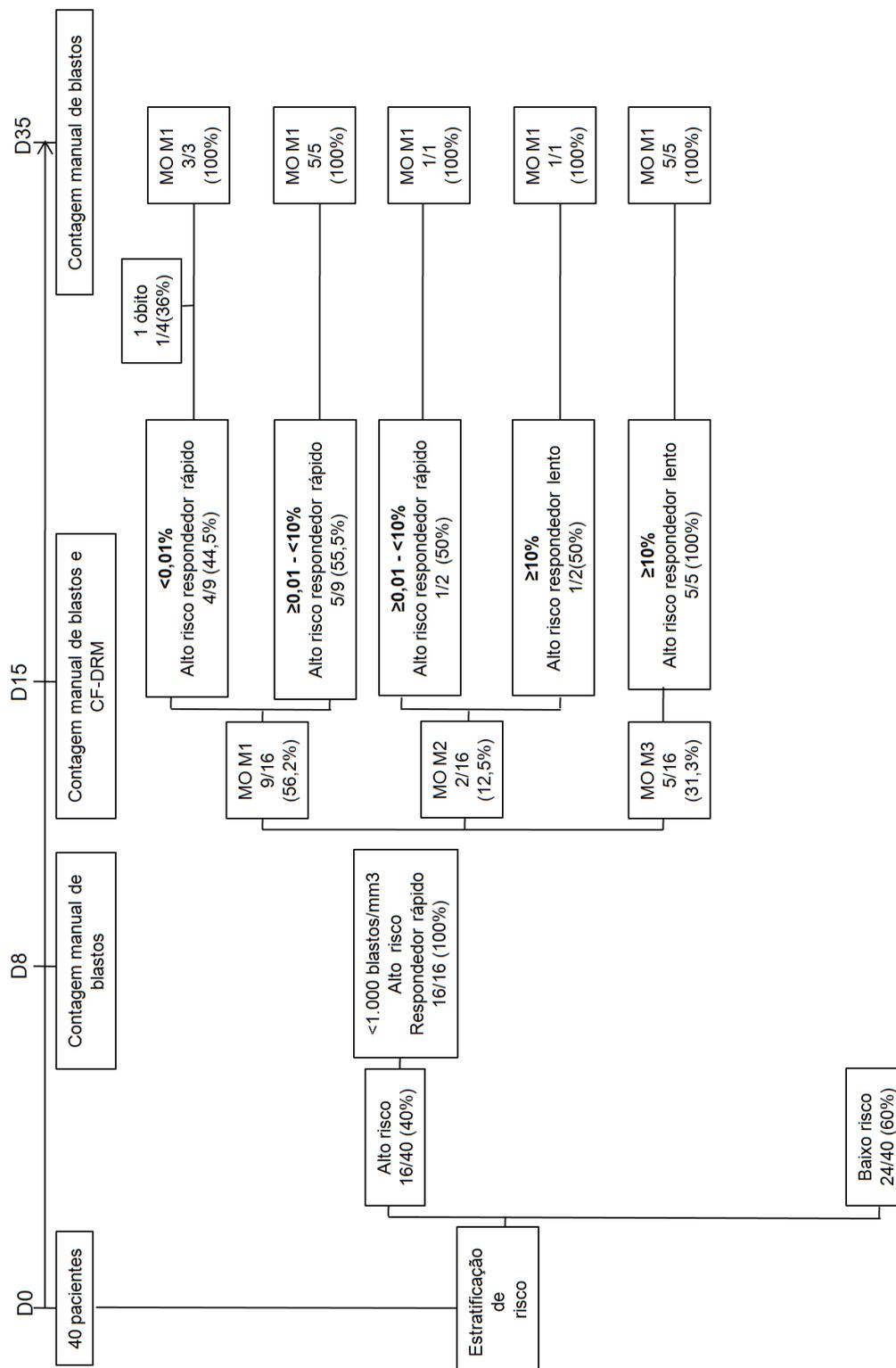


Figura 14- Fluxograma da re-estratificação de risco (Alto Risco)

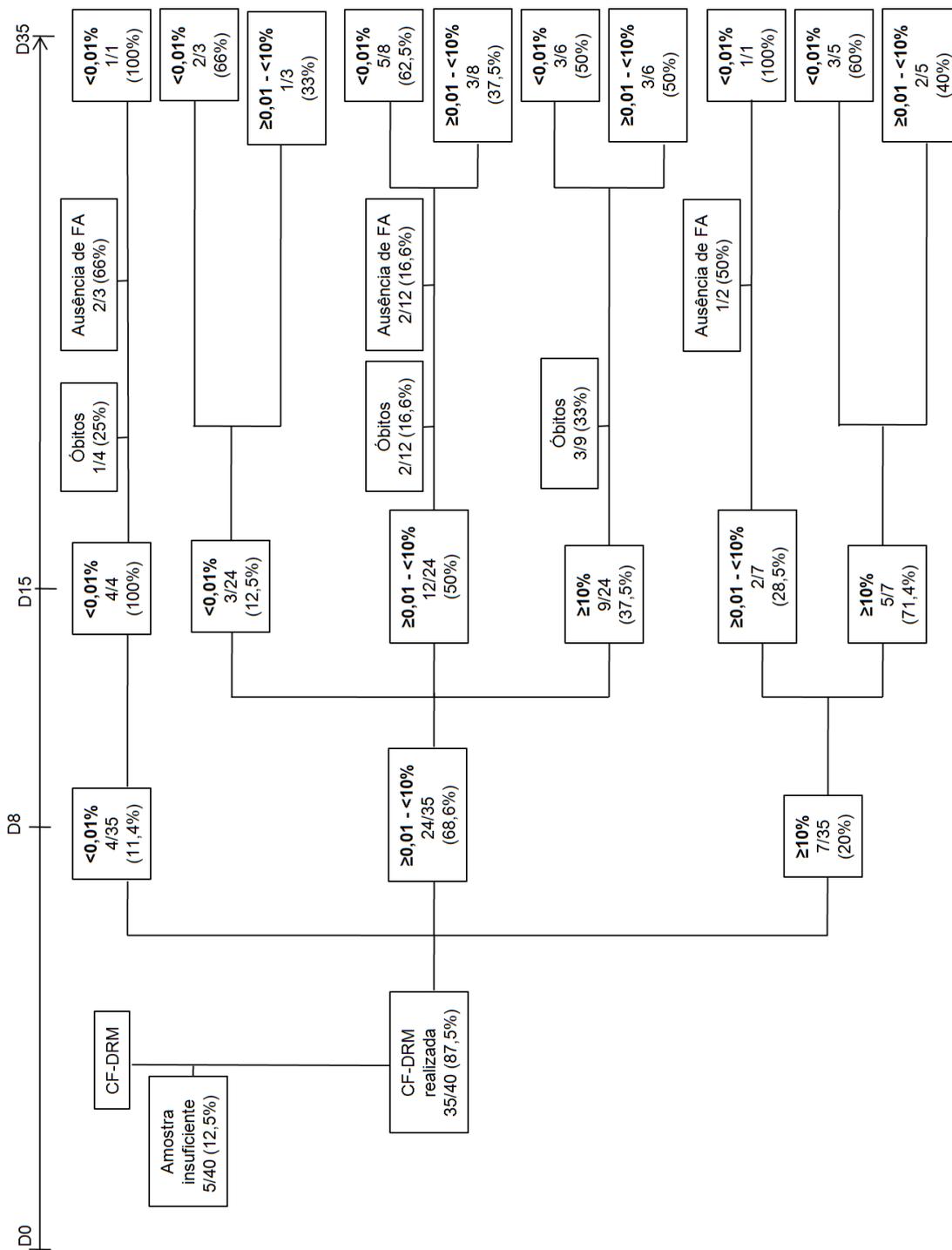


Figura 15- Fluxograma do seguimento da CF-DRM

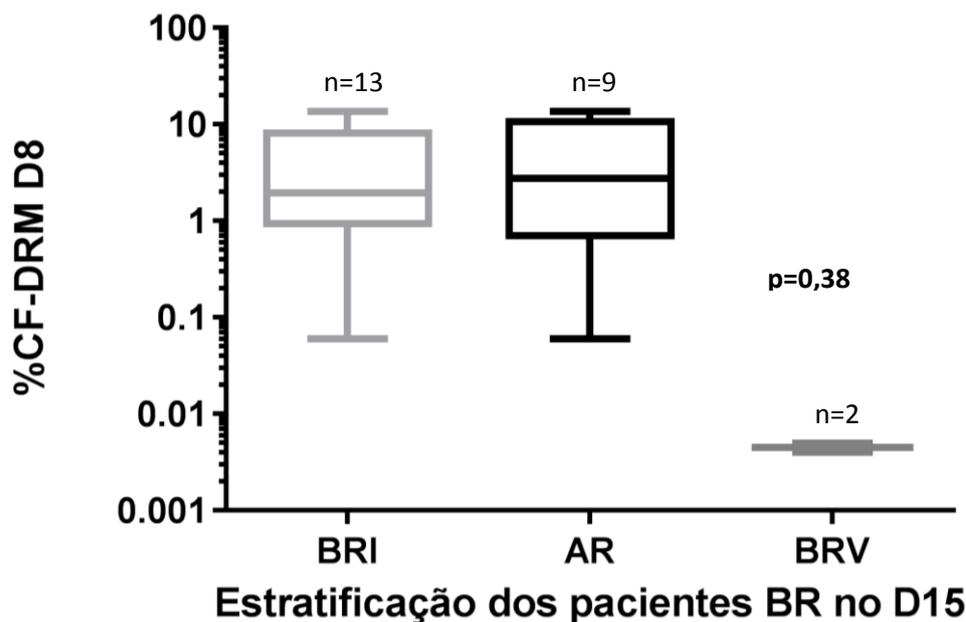


Figura 16- Comparação entre o resultado da CF-DRM no D8 em SP com a estratificação de risco do D15 para pacientes inicialmente baixo risco (BR) ao diagnóstico. Teste paramétrico de Anova ($p=0,38$).

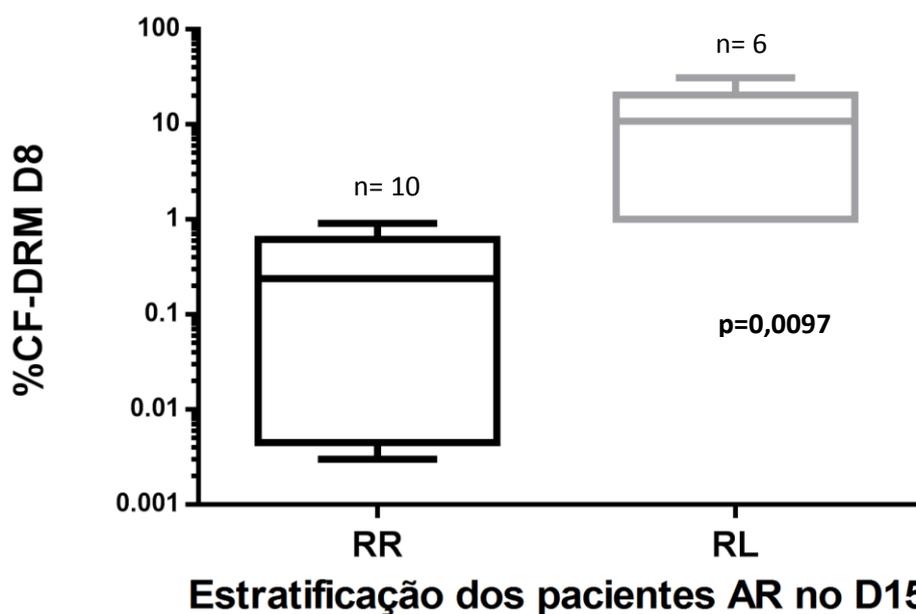


Figura 17- Comparação entre o resultado da CF-DRM no D8 em SP com a estratificação de risco do D15 para pacientes inicialmente alto risco (AR) ao diagnóstico. Teste paramétrico t ($p=0,0097$)

Tabela 4. Distribuição segundo a frequência do gênero, idade e leucócitos em relação ao DRM no D8, D15 e D35 das crianças portadoras de LLA, Manaus - AM.

Variáveis	DRM - D8 (n = 35)			DRM - D15 (n = 40)			DRM - D35 (n = 29)		
	<0.01	≥0.01%	p*	<0.01	≥0.01%	p*	<0.01%	≥0.01%	p*
Gênero			0,419			0,649			0,148
Feminino	1 (25,0)	14 (45,2)		3 (42,9)	14 (42,4)		5 (27,8)	6 (54,5)	
Masculino	3 (75,0)	17 (54,8)		4 (57,1)	19 (57,6)		13 (72,2)	5 (45,5)	
Idade (anos)			0,674			0,471			0,283
< 9	3 (75,0)	22 (71,0)		6 (85,7)	24 (72,7)		13 (72,2)	6 (54,5)	
≥ 9	1 (25,0)	9 (29,0)		1 (14,3)	9 (27,3)		5 (27,8)	5 (45,5)	
Leucometria			0,019			0,002			0,592
< 50.000	1 (25,0)	27 (87,1)		2 (28,6)	30 (90,9)		14 (77,8)	9 (81,8)	
≥ 50.000	3 (75,0)	4 (12,9)		5 (71,4)	3 (9,1)		4 (22,2)	2 (18,2)	

* Teste exato de Fisher.

Valor de p em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5% de significância.

6 DISCUSSÃO

A rapidez com que os blastos leucêmicos são eliminados após o início do tratamento e o nível de doença residual no final da indução estão associados com os resultados a longo prazo. Estudos revelam que o valor prognóstico da pesquisa de DRM por CF ou técnicas moleculares pode ser superior a outros critérios clínicos e laboratoriais tradicionalmente utilizados na estratificação de risco (2,20,24,28,41,71). Em nosso estudo, avaliamos a distribuição segundo a frequência de gênero, idade e leucócitos em relação a negatividade ($<0,01\%$) ou positividade ($\geq 0,01\%$) da CF-DRM no D8, D15 e D35. Observamos que houve diferença estatística apenas para leucometria e resultado da CF-DRM no D8 e D15. Curiosamente, pacientes com leucometria inicial <50.000 leucócitos/ mm^3 apresentaram maior frequência de DRM positiva no D8 e D15 (tabela 4). Tal resultado não é compatível com outras séries e pode ser fruto de distorção estatística devido o tamanho limitado da amostra ou efeito biológico desconhecido cuja investigação merece estudos futuros.

A detecção de blastos residuais através da análise morfológica também é um importante fator prognóstico, porém, limitado pela sensibilidade da técnica e a difícil distinção entre linfoblastos e precursores linfóides imaturos normais (hematogônias) (17,18,24). Nosso estudo verificou que contagens manuais com até 5% de blastos em SP no D8 ou em MO no D15 e D35 não apresentaram correlação com o resultado da CF-DRM, devido à limitação da sensibilidade da avaliação morfológica. Houve correlação entre contagem de blastos e DRM em dois momentos: amostras com mais de 5% de blastos em SP no D8 (figura 10) apresentaram moderada correlação ($r=0,54$; $p=0,0008$) e amostras de MO no D15 (figura 11) apresentaram forte correlação com o resultado da CF-DRM ($r= 0,91$; $p<0,0001$). No D15, a correlação entre contagem manual de blastos e CF-DRM está compatível com outras séries e reforça a importância da pesquisa DRM para os pacientes em completa remissão morfológica ($\text{MO} < 5\%$ de blastos), pois nestes casos a correlação entre as duas metodologias é mínima ou inexistente (25,27). No que se refere ao D8, apesar da correlação entre o percentual da contagem manual de blastos e CF-DRM ser moderada em amostras com mais de

5% de blastos, é importante ressaltar que, em número absoluto, todos os pacientes apresentaram menos de 1000 blastos/mm³ por ambos os métodos. Dessa forma, essa análise de correlação permite inferir que a CF-DRM no D8 não modificaria a re-estratificação de risco dos pacientes utilizando como critério o número absoluto de blastos, mas proporcionaria um refinamento da resposta terapêutica com base em intervalos de DRM cuja sensibilidade poderia justificar sua aplicação na re-estratificação de risco, como já ocorre em alguns protocolos (13,53,67).

No D8, o parâmetro utilizado para re-estratificação de risco, na maioria dos protocolos de tratamento, é o valor absoluto de blastos (29,52,57). Em nossa casuística, apesar de todos os pacientes apresentarem <1.000 blastos/mm³ em SP e, portanto, terem sido re-estratificados em respondedores rápidos, mais da metade dos pacientes (68,6%) apresentaram níveis intermediários de DRM ($\geq 0,01$ - <10%); 20% altos níveis ($\geq 10\%$) e 11,4% DRM negativa ($\leq 0,01\%$). No seguimento, os pacientes que no D8 apresentaram DRM negativa evoluíram no D15 e D35 com manutenção da DRM negativa. O acompanhamento da parcela de pacientes com níveis intermediários de DRM no D8 revelou que, no D15, 50% mantinha DRM em níveis intermediários; 37,5% em altos níveis e, em apenas 12,5%, a DRM foi negativa. Para os pacientes com altos níveis de DRM no D8, 71,4% mantiveram altos níveis no D15; 28,5% níveis intermediários e nenhum paciente apresentou DRM negativa no D15 (figura 15). A análise descritiva desses resultados parece revelar a pesquisa de CF-DRM no D8 como metodologia de refinamento da estratificação de risco.

Nesse sentido, os protocolos do COG já incluem a pesquisa de CF-DRM no D8 como critério de re-estratificação de grupo de risco de recaída da seguinte forma: pacientes estratificados ao diagnóstico com baixo risco que apresentarem no D8 DRM negativa (<0,01%) mantiveram sua estratificação em baixo risco; aqueles com níveis de DRM $\geq 0,01$ - <1% serão re-estratificados em baixo risco intermediário, e níveis $\geq 1\%$, em alto risco. Os pacientes que ao diagnóstico forem estratificados como baixo risco intermediário, devido ausência de alterações genéticas de bom prognóstico, manterão sua estratificação de risco se DRM

presente em níveis $<1\%$, níveis de DRM $\geq 1\%$ re-estratificam o paciente em alto risco. Os pacientes já estratificados como alto risco ou muito alto risco ao diagnóstico, não sofrerão re-estratificação no D8 ^(13,53).

Aplicando-se o conceito do COG para os pacientes inicialmente baixo risco de nossa amostra, teríamos, já no D8, 68,4% dos pacientes re-estratificados como alto risco (DRM $\geq 1\%$), 31,5% em baixo risco intermediário (DRM $\geq 0,01 - <1\%$) e 5,2% mantendo sua estratificação em baixo risco (DRM $<0,01\%$). Interessante observar que o grupo de pacientes que apresentou no D8 DRM em níveis $\geq 1\%$ se comportou da seguinte forma no D15: 53,8% apresentou níveis de DRM $\geq 0,01 - <10\%$ sendo re-estratificado como baixo risco intermediário e 46,1% apresentou níveis de DRM $\geq 10\%$ sendo reestratificado em alto risco. No grupo de pacientes que apresentou no D8 DRM $\geq 0,01 - <1\%$, 50% foi re-estratificado no D15 em baixo risco intermediário (DRM $\geq 0,01 - <10\%$); 33,3% foi re-estratificado em alto risco (DRM $\geq 10\%$) e 16,6% em baixo risco verdadeiro (DRM $<0,01\%$). Os pacientes que apresentaram DRM negativa ($<0,01\%$) no D8, mantiveram níveis de DRM negativa no D15 sendo estratificados em baixo risco verdadeiro.

Nesse contexto, em nossa limitada casuística, observamos que todos os pacientes inicialmente baixo risco que apresentaram CF-DRM positiva no D8 sofreram re-estratificação de risco no D15 para grupos intermediários ou de alto risco. Em contraste, todos os pacientes inicialmente baixo risco que apresentaram CF-DRM negativa no D8 foram re-estratificados no D15 em baixo risco verdadeiro. Portanto, a pesquisa de CF-DRM no D8, parece predizer com maior refinamento a evolução dos resultados da CF-DRM no D15 para pacientes inicialmente baixo risco quando comparada à contagem manual de blastos, possibilitando identificar mais precocemente os pacientes que sofrerão re-estratificação de risco para grupos intermediários ou de alto risco. Contudo, a utilização dos parâmetros do COG para definir risco no D8 não permitiu a distinção entre os grupos que no D15 foram re-estratificados em baixo risco intermediário e alto risco (figura 16). Uma limitação desta análise é o baixo número de indivíduos classificados como baixo risco verdadeiro ($n = 2$), que

limitou o poder estatístico. A expansão deste número é fundamental para se confirmar o efeito observado.

Avaliamos também o comportamento da CF-DRM no D8 para os pacientes inicialmente alto risco. Todos os pacientes re-estratificados no D15 em respondedores rápidos apresentaram no D8 CF-DRM em níveis $<1\%$, enquanto que, pacientes re-estratificados no D15 em respondedores lentos apresentaram níveis de CF-DRM $\geq 1\%$ no D8. Os resultados sugerem que níveis de CF-DRM $\geq 1\%$ no D8 podem identificar precocemente os pacientes alto risco que serão re-estratificados em respondedores lentos no D15 (figura 17).

Portanto, nosso estudo aponta o potencial da CF-DRM no D8 para reconhecer grupos de pacientes que sofrerão re-estratificação de risco mais tardiamente no protocolo GBTLI-2009, podendo oferecer uma oportunidade para intensificação terapêutica mais precoce. Esse efeito foi evidenciado mais claramente para pacientes alto risco ao diagnóstico, não sendo possível avaliar a importância da CF-DRM no D8 para pacientes baixo risco ao diagnóstico devido ao número limitado de pacientes no grupo baixo risco verdadeiro. Nesse contexto, estudos futuros com amostras maiores são necessários no sentido de comparar o resultado da DRM nesse momento com a contagem manual de blastos em SP, com vistas a uma possível incorporação da detecção de CF-DRM no D8 como critério de re-estratificação de risco para o protocolo brasileiro.

No protocolo GBTLI-2009, o monitoramento da CF-DRM com o objetivo de re-estratificação de risco no D15 já é bem estabelecido. Observamos em nossa amostra que, no D15, a aplicação do resultado da CF-DRM foi fundamental para re-estratificação de risco dos pacientes cuja análise morfológica foi compatível com MO M₁ e MO M₂ (figura 13 e figura 14). A vantagem adicional da CF-DRM em pacientes classificados como MO M₁ pode ser explicada pela limitação da avaliação morfológica, cuja sensibilidade compromete a detecção de blastos residuais em pacientes com menos de 5% na contagem manual^(18,23). No caso dos pacientes classificados como MO M₂, observamos que todos os pacientes apresentaram CF-DRM positiva do D15, porém, com ampla variação nos níveis

de positividade. Portanto, acreditamos que a vantagem adicional da CF-DRM para os pacientes classificados como MO M₂ se justifique por proporcionar melhor refinamento da estratificação de risco com base nos intervalos de positividade de DRM. Por outro lado, para os pacientes classificados como MO M₃ o resultado da CF-DRM no D15 não apresentou vantagem adicional comparado a avaliação morfológica, provavelmente porque contagens manuais superiores a 25% de blastos na MO invariavelmente se correlacionam com altos níveis de CF-DRM ($\geq 10\%$) e, portanto, são concordantes na re-estratificação de risco.

Utilizando a pesquisa de CF-DRM no D35 observamos que apesar de todos os pacientes de nossa amostra apresentarem completa remissão morfológica (MO M₁), 37,9% apresentaram CF-DRM positiva em níveis $\geq 0,01$ até 2,4% (figura 8). Esse resultado, apesar de relevante, não foi utilizado na re-estratificação de risco dos nossos pacientes ao término da indução, já que o protocolo GBTLI-2009 preconiza a re-estratificação de risco no D35 com base na pesquisa de PCR-DRM, cuja vantagem adicional é a maior sensibilidade da técnica ⁽⁶⁹⁾. Contudo, há uma boa correlação entre CF-DRM e PCR-DRM quando DRM presente em níveis $\geq 0,01\%$ ^(18,37,63). Nesse sentido, a CF-DRM contribuiu com a identificação de 37,9% dos pacientes de nossa amostra que mantiveram DRM positiva em níveis $\geq 0,01$ até 2,4% ao término da indução apesar da completa remissão morfológica. Tal resultado revela a CF-DRM como potencial metodologia de análise para re-estratificação de risco, com vantagem adicional comparada à morfologia em locais onde a pesquisa de PCR-DRM não está implantada.

Esses dados apontam a relevância da inclusão do resultado da pesquisa de DRM na estratificação de risco durante a terapia de indução, porém, o custo operacional da técnica pode se tornar um fator limitante ^(27,71). Em nosso estudo, a pesquisa de DRM foi realizada por CF utilizando um painel limitado de anticorpos com custo relativamente baixo que foi aplicável em 87,5% dos pacientes. Esta frequência de imunofenótipos aberrantes é semelhante ao que foi reportado em outras séries ^(18,23, 27).

Nesse contexto, o presente estudo contribuiu com a padronização da pesquisa de CF-DRM na FHEMOAM, avaliando sua aplicação na estratificação de risco de recaída em nossa região. Os pacientes de baixo risco puderam ser enquadrados em programa de tratamento menos agressivo, reduzindo eventuais sequelas relacionadas a quimioterapia e permitindo economizar com os custos de internação e medicamentos. Além disso, com base no monitoramento da DRM, os pacientes de alto risco receberam tratamento intensificado com vistas à diminuição das taxas de recaída e, conseqüentemente, custos para o sistema de saúde. Uma relevante contribuição para a comunidade científica foi o fornecimento de dados sobre o resultado da avaliação de DRM em estágios muito precoces do tratamento (D8), questão ainda não consensual na literatura.

Em resumo, essa foi a primeira pesquisa sobre doença residual mínima em crianças com leucemia realizada no Estado do Amazonas, contribuindo para melhor compreensão da heterogeneidade da doença nesta região, bem como para busca da melhor decisão terapêutica que possa influir positivamente no prognóstico e sobrevida das crianças atendidas nesta Instituição.

7 CONCLUSÕES

- Leucometria inicial <50.000 leucócitos/mm³ apresentou associação estatisticamente significativa com DRM positiva no D8 ($p=0,019$) e D15 ($p=0,002$).
- Houve correlação entre contagem manual de blastos e o resultado da CF-DRM em amostras com mais de 5% de blastos do D8 ($r= 0,54$; $p=0,0008$) e D15 ($r=0,91$; $p<0,0001$).
- A aplicação do resultado da CF-DRM permitiu a re-estratificação de risco dos pacientes cuja análise morfológica foi compatível com MO M₁ e MO M₂ no D15.
- A pesquisa de CF-DRM no D8 permitiu reconhecer grupos de pacientes que sofreriam re-estratificação de risco mais tardiamente no protocolo GBTLI-2009. No caso dos pacientes inicialmente alto risco os resultados sugerem que níveis de CF-DRM $\geq 1\%$ no D8 podem identificar precocemente os pacientes que serão re-estratificados em respondedores lentos no D15 ($p=0,0097$).
- A pesquisa de CF-DRM no D35 foi capaz de detectar uma parcela de pacientes com DRM positiva apesar da completa remissão morfológica, podendo se tornar uma alternativa em locais onde a pesquisa de PCR-DRM não está implantada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abla O, Friedman J, Doyle J. Performing bone marrow aspiration and biopsy in children: Recommended guidelines. *Paediatrics Children Health* 2008; 13(6):499-501.
2. Adin-Cinar S, Kucuksezer UC, Deniz G. Implications os minimal residual disease by flow cytometry in pediatric acute leukemias. *Internation trends in immunity* 2013 Out; 4 (1): 51-61
3. Arango H. *Bioestatística Teórica e Computacional*. 2º ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001.
4. Bain BJ. *Leukaemia diagnosis*. 4nd ed. London: Wiley-Blackell; 2010.
5. Barreto J, Mendonça N. *Diagnóstico precoce do câncer na criança e no adolescente*. Clínica Onco 2001.Salvador, Bahia.
6. Bartram CR, Schrauder A, Köhler R, Schrappe M. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Dtsch Arztl Int*. 2012; 109(40): 652-8.
7. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *Journal of Clinical Oncology* 2009 Nov; 27(31): 5168-74.
8. Beutler E. Treatment of acute leukemia: past, present, and future. *Leukemia* 2001 Jan;15(1):658–61.
9. Bhatia S, Sather H, Heerema NA, Trigg ME, Gaynon PS, Robison LL. Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* Sept 2002; 100(6): 1957-64.
10. Bradstock KF, Janossy G, Tidman N, Papageorgiou ES, Prentice HG, Willoughby, et al. Immunological monitoring of residual disease in treated thymic acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 1981;5:301-9.
11. Brandalise S, Odone V, Pereira W, Andrea M, Zanichelli M, Aranega V. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. ALL Brazilian Group. *Leukemia*. 1993; 7 Suppl 2:S142-5
12. Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood Journal of Hematology* 2000 July; 96 (1): 24-33.

13. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger S, Bowman P, Carroll A, Carroll W, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008 Apr; 111(12): 5477-85.
14. Buffler P, Kwan M, Reynolds P, Urayama K. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: Appraising the evidence. *Cancer Investigation* 2005; 1:60–75.
15. Campana D. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999; (38):139-152.
16. Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* Oct 2009; 23 (5):1083-98.
17. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2010; 7-12.
18. Campana D, Coustan-Smith E. Measurements of treatment response in childhood acute leukemia. *The Korean Journal of Hematology* Dec 2012; 47(4): 245-54.
19. Cavalcante L. Padronização de método molecular para detecção de doença residual mínima (DRM) em crianças portadoras de leucemia linfóide aguda tratadas no Distrito Federal [dissertação]. Brasília (DF): Universidade Católica de Brasília; 2012.
20. Cheg HS, Lau Mk, Li Kon C, Chang NP, Rosalina KL, Cheng CK et al. Minimal residual disease-based risk stratification in Chinese childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry and plasma DNA quantitative polymerase chain reaction. *Plos one* Jul 2013;8 (7):1-10
21. Chiabai, MA. Polimorfismos farmacogenéticos relacionados a drogas utilizadas no tratamento da leucemia linfóide aguda na população Brasileira [dissertação]. Brasília (DF): Universidade Católica de Brasília; 2010.
22. Comar SR, Machado NA, Dozza TG, Haas P. Análise citológica do líquido cefalorraquidiano. *Estud Biol.* Jan 2009; 73:93-102.
23. Coustan Smith E, Sancho J, Behm FG, Michae IL, Hancock ML, Boyett JM, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic

- cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002 Jul; 100(1): 52–58
24. Coustan-Smith E, Campana D. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23:347-58.
25. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* Dec 2011; 117(23): 6267-75
26. Degos L, Bennett J, Virchow R, Donn e A: The first description of leukemia. *The Hematology Journal* 2001 Jan; 2(1):1.
27. Delbuono E, Maekawa MR, Latorre MR, Petrilli AS, Braga JA, Lee ML. Simplified flow cytometric assay to detect minimal residual disease in childhood with acute lymphoblastic leukemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* Jan 2008; 30(4):281-286
28. Duncan ME, Goldacre MJ. Analysis of early disease response in childhood acute lymphoblastic leukaemia: can peripheral blood replace bone marrow analysis?. *British Journal of Haematology* Mar 2013;161 (1):738-51
29. D rdelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig WD, G tz N, Viehmann S, et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1209–17.
30. Emerencino M. As características moleculares das leucemias agudas de lactentes em coorte brasileira [disserta o]. Rio de Janeiro (RJ): Faculdade de Ciências Biomédicas; 2006.
31. Farias M, Castro S. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2004 abril; 40(2): 91-98.
32. Ferreira, J. Incidência, mortalidade e sobrevida de leucemia e linfoma no município de Fortaleza, Ceará [disserta o]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; 2010.
33. Fleury Medicina e Saúde. Manual de hematologia. São Paulo (Brasil); 2012. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/medicos/educacao-medica/manuais>

34. Fiona E, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941-67
35. Fontelles MJ , Simões MG , Almeida JC, Fontelles RGS. Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra. *Revista Paraense de Medicina* Abr 2010; 24(2): 57-64
36. Freireich E, Wiernik P, Steensma D. The Leukemias: A Half-Century of Discovery 2014 Sept; 32(2):1-7.
37. Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, Panzer Grümayer R, Buldini B, Silvestri D et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* Apr 2012; 97(10):1586-93.
38. Ganazza M. Estudo de doença residual mínima em leucemia linfóide aguda da criança e do adolescente [tese]. São Paulo (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2014.
39. Gervasini G, Vagace JM. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Genetics* Nov 2012; 3(249): 1-11.
40. Hafiz MG, Mannan MA. Nutritional status at initial presentation in childhood acute lymphoblastic leukemia and its effect on induction of remission. *Mymensingh medical journal* 2008;17(2):46-51.
41. Huel M, Matthes T. Minimal residual disease monitoring: the new standard for treatment evaluation of haematological malignances?. *The European Journal of Medical Sciences* Jan 2014;144:w13907
42. Horvath A, Baghiu MD, Pavai Z, Chincesan M, Grama A. A 10-year follow-up of acute lymphoblastic Leukemia patients in a regional pediatric Hematology center from romania. *Jurnalul pediatriei* Jul 2011; 14(55): 3-8.
43. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. População e indicadores sociais. Última modificação: 28/08/2014. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=130260&search=amazonas|manaus>
44. Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia Research* 2012 Jan; 36(1):6-13.

45. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Hematologia Prática de Dacie e Lewis. 9º ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2006.
46. Mac Arthur A, Mc Bride M, Spinelli J, Tamaro S, Gallagher R, Theriault G. Risk of childhood leukemia associated with vaccination, infection, and medication use in Childhood: The Cross-Canada childhood leukemia study. American Journal of Epidemiology 2007 Dec; 167(5):598-606.
47. Maldonado-Alcázar A, Núñez-Enríquez JC, García-Ruiz CA, Fajardo-Gutierrez A, Mejía-Arangur JM. Alterations of nutritional status in childhood acute leukemia. Research Unit in Clinical Epidemiology Hospital of Pediatrics 2013 Apr; 277-95.
48. Maluf SW, Riege IM. Citogenética Humana. 2º ed. São Paulo: Editora Artmed; 2011.
49. Melo J. Leucemia linfóide aguda [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade Paulista; 2011.
50. Mesquita DR, Córdoba JC, Magalhães IQ, Córdoba MS, Oliveira JRC, Gonçalves A, Ferrari I, Martins-de-Sá C. Molecular and chromosomal mutations among children with B-lineage lymphoblastic leukemia in Brazil's Federal District. Genetics and Molecular Research 2009 Mar; 8 (1): 345-53.
51. Ministério da Saúde. Câncer na criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Rio de Janeiro: INCA; 2008. Disponível em: http://www.inca.gov.br/tumores_infantis/
52. Moricke A. Prediction of outcome by early response in childhood acute lymphoblastic leukemia. Klin Pediatric 2013; 1:50-56
53. National Cancer Institute. Childhood acute lymphoblastic leukemia treatment. Bethesda: NCI; 2013. Disponível: <http://cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/childALL/HealthProfessional>.
54. Obro N, Ryder L, Madsen, H, Andersen MK, Lausen B, Hasle H, et al. Identification of residual leukemic cells by flow cytometry in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: verification of leukemic state by flow-sorting and molecular/cytogenetic methods. Haematologica 2012; 97(1): 137-41

55. Piller GJ. Leukaemia: a brief historical review from ancient times to 1950. *British Journal of Haematology* 2001 Feb; 112(2):282-92.
56. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Rivera GK, Howard SC, Ribeiro RC et al. Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children. *Jama* 2003 Oct; 290 (15):2001-007
57. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004; 118-145.
58. Pui CH, Mullighan C, Evans W, Relling M. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood Journal of Hematology* 2012 Ago; 120(6): 1165-74
59. Quixabeira V, Saddi V. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. *RBAC* 2008 Junho; 40(3): 199-202.
60. Ratei R, Basso G, Dworzak M, Gaipa G, Veltroni M, Rhein P, et al. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia research* 2009 Mar; 23 (3):528-34.
61. Reichmann R. Acute lymphoblastic leukaemia: A review. *Trinity Student Medical Journal [periódicos da internet]* 2000 May [acesso em 20 mar 2013];1(1). Disponível em: <http://www.tcd.ie/tsmj/2000/2000PDF/ALL.pdf>
62. *Revista Scientific American- Edição especial nº3, 2008.*
63. Ryan J, Quinn F, Meunier A, Boublikova L, Crampe M, Tewari P, et al. Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukaemia patients at multiple time-points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. *British Journal of Haematology* Ago 2008; 144 (1):107-15
64. Scrideli CA, Kashima S, Cipolotti R, Defavery R, Bernardes JE, Tone LG. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoid leukemia: comparison of three detection methods by PCR. *Leuk Res.* 2002; 26(5): 431-8.

65. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk-and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 2007; 100(3): 926-35.
66. Silva F. Avaliação epidemiológica das leucemias linfoblásticas em crianças brasileiras e implicação de infecções na sua patogênese [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Câncer; 2009.
67. Silverman L. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Currently applied prognostic Factors. In: Siop education book international society of paediatric oncology. 2nd ed. Boston: SIOP; 2010. P. 18-24.
68. Sinnet D, Labuda D, Krajinovic M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers – the childhood leukemia experience. *Familial Cancer*. 2006; 5: 35-47.
69. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Protocolo Brasileiro de tratamento da leucemia linfóide aguda na infância GBTLI LLA-2009. São Paulo: Campinas; 2011. P. 1-347.
70. Souza M. Estudo epidemiológico dos casos de leucemia linfóide aguda nas crianças e adolescentes tratados no Centro de Tratamento Onco hematológico Infantil – CETOHI, do hospital regional de Mato Grosso do Sul [dissertação]. Campo Grande (MS): Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2013.
71. Stanulla M, Scharauder A. Bridging the gap between the north and south of the world: the case of treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2009; 94 (6): 748-52.
72. Taylor C; Lillis C; Lemone P. Fundamentos de Enfermagem: a arte e a ciência do cuidado de enfermagem. 5^o ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.
73. Verma RS, Babu A. Human Chromosomes – Principles and Techniques. 2^o ed. New York: McGraw-Hill; 1995.
74. Vieira S. Bioestatística, tópicos avançados. 2^o ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2004.
75. Volejnikova J, Mejstřicova E, Valova T, Reznickova L, Holandska L, Mihal V et al. Minimal residual disease in peripheral blood at day 15 identifies a

- subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with superior prognosis. *Haematologica* 2011 96 (12): 1815-21.
76. Wang XM. Advances and issues in flow cytometric detection of immunophenotypic changes and genomic rearrangements in acute pediatric leukemia. *Translation Pediatrics* 2014; 3(2):149-155
77. World Health Organization. Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4^{ed}. IARC: Lyon; 2008. P. 1-439.

ANEXOS

9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa: **Estudo da doença residual mínima e sua relação com critérios de estratificação de risco em leucemia linfóide aguda na infância**, sob a responsabilidade do pesquisador (a) Thais Ditolvo da Costa Salina , a qual pretende detectar a presença de doença residual mínima em crianças com leucemia linfóide aguda. Sua participação é voluntária e se dará por meio de permitir a coleta de sangue periférico e aspirado da medula óssea (mielograma), realizado em sala de procedimento por profissional de saúde capacitado e sua amostra será encaminhada para o laboratório da FHEMOAM.Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são referentes ao procedimento da coleta da amostra e incluem sangramento excessivo, dor e/ou infecção no local da punção. Se houver tais complicações, serão oferecidos suporte e tratamento na FHEMOAM. Se o (a) Sr (a) aceitar participar, estará fornecendo dados para publicação em periódicos científicos que contribuirão para o entendimento da doença e conseqüente melhoria no tratamento. Se for detectada doença residual mínima, o (a) Sr (a) será comunicado sobre o resultado dos exames e receberá o acompanhamento na FHEMOAM.O (A) Sr (a) tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento de participação em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa, pois continuará recebendo o acompanhamento e tratamento para a doença. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço : Av. Constantino Nery, 4397, Chapada - 69050-002 - Manaus, AM , pelo telefone (92) (3655-0100). Em menores de idade, o estudo só será realizado mediante autorização de seu responsável legal. Consentimento Pós- Informação Eu, _____ , fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto (ou permitir que o (a) menor _____ participe), sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

_____ Data: ___/ ___/ _____

Assinatura do participante

Assinatura do Pesquisador Resp Impressão do dedo polegar, caso não saiba assinar



9.2 FICHA CLÍNICA DO PACIENTE

	<p>LABORATÓRIO DE MARCADORES CELULARES</p> <p>ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA E SUA RELAÇÃO COM CRITÉRIOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA</p>
---	---

Reg lab: _____ Data: _____ Peso: _____ Atura: _____ SC: _____

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Renda familiar mensal: _____ Escolaridade materna: _____

DN: _____ Local nasc.: _____ Proc.: _____ Cor: _____

HD: _____

1. AO DIAGNÓSTICO:

Estratificação de Risco: _____

Grupo Etário : () ≥ 1 e < 9 () < 1 e ≥ 9 ; Infiltração SNC: () Presente () Ausente;

WBC ao diagnóstico () < 50.000 () > 50.000 ;

Citogenética de risco: () Presente _____ () Ausente

Imunofenotipagem: _____

2. BLASTOS NO D8 DATA: ___/___/_____

ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO: _____

CONCLUSÃO: _____ () < 1000 blastos () > 1000 blastos

CITOMETRIA: ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO: _____

3. DRM D15: DATA: ___/___/_____ ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO: _____

MO: () M1: $< 5\%$ de blastos () M2: 5-25% () M3 $> 25\%$

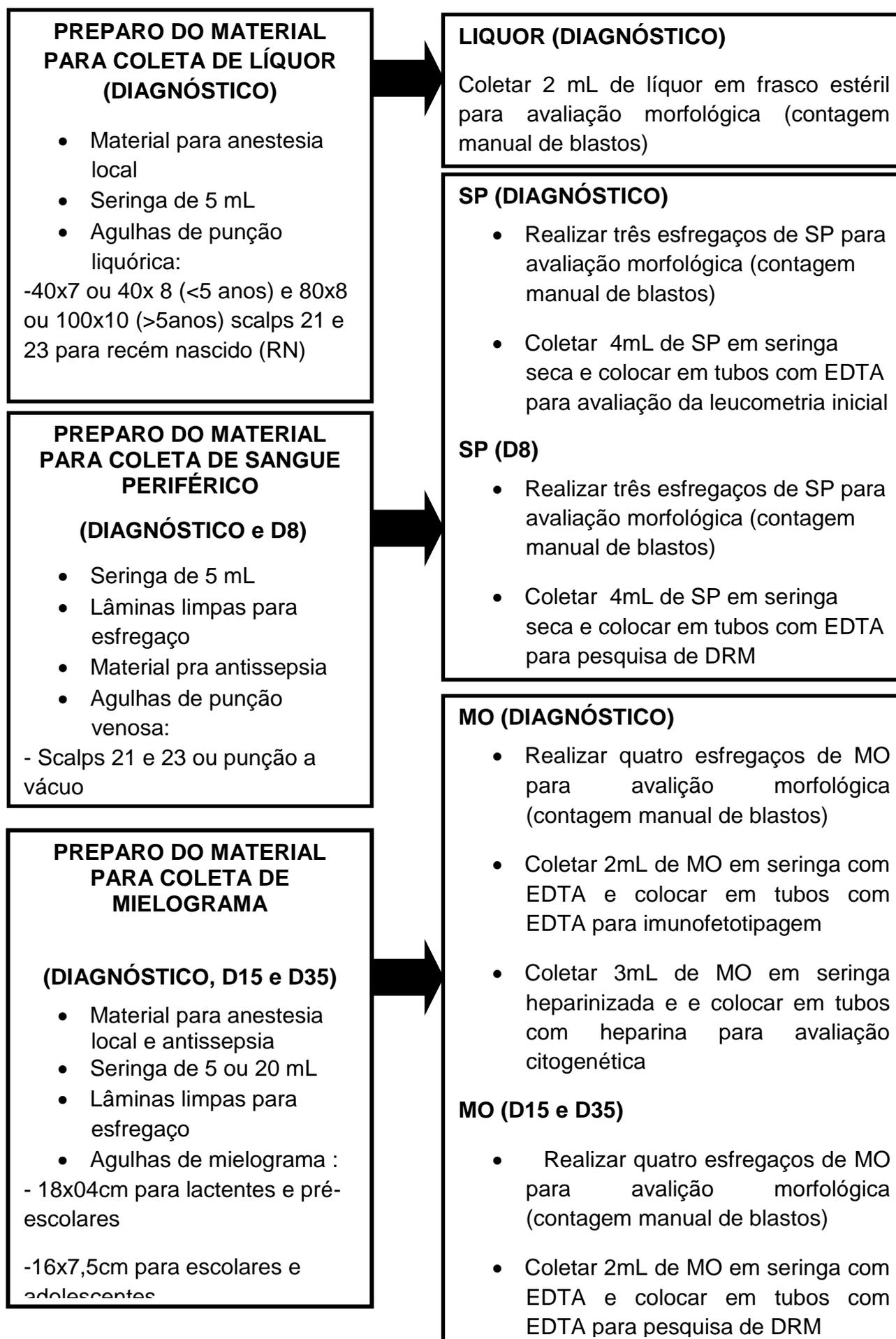
RESULTADO DRM: _____

4. DRM D35: DATA: ___/___/_____ ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO: _____

MO: () M1: $< 5\%$ de blastos () M2: 5-25% () M3 $> 25\%$

RESULTADO DRM: _____

9.3 FLUXOGRAMA DA COLETA DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS



9.4 SISTEMATIZAÇÃO DAS ETAPAS DO ESTUDO

Diagnóstico

- Preenchimento do TCLE e ficha clínica do paciente
- Coleta de mielograma (contagem manual de blastos, imunofenotipagem, identificação de fenótipo anômalo e análise citogenética)
- Coleta de líquido (contagem manual de blastos)
- Coleta de sangue periférico (leucometria inicial)
- Estratificação do risco de recaída ao diagnóstico com base nos critérios clínicos e laboratoriais do protocolo GBTLI-2009

Oitavo dia do tratamento (D8)

- Coleta de sangue periférico (contagem manual de blastos e pesquisa de DRM)
- Reestratificação do risco de recaída segundo a contagem manual de blastos conforme protocolo GBTLI-2009

Décimo quinto dia do tratamento (D15)

- Coleta de mielograma (contagem manual de blastos e pesquisa de DRM)
- Reestratificação do risco de recaída segundo o resultado da DRM e contagem manual de blastos, conforme protocolo GBTLI-2009

Trigésimo quinto dia do tratamento (D35)

- Coleta de mielograma (contagem manual de blastos e pesquisa de DRM)
- Reestratificação do risco de recaída segundo o resultado da DRM e contagem manual de blastos, conforme protocolo GBTLI-2009

9.5 PROTOCOLOS DE COLETA DE MATERIAS BIOLÓGICOS

Sangue periférico

1. Identificar o paciente e proceder à identificação dos tubo
2. Garrotear o membro a ser avaliado
3. Selecionar o local da punção
4. Realizar a antissepsia da pele no local a ser puncionado com o algodão embebido em álcool a 70%, com movimento centrífugo (circular, único, do centro para fora)
5. Afastar a pele e introduzir a agulha ou scalp para punção em ângulo de 45°
6. Proceder a aspiração do conteúdo venoso

Aspirado medular

1. O paciente será posicionado na mesa de procedimento, expondo, na dependência da faixa etária, a crista ilíaca posterior ou platô tibial
2. Realizar antissepsia com álcool a 70%
3. Proceder a confecção de um botão anestésico no local da punção com lidocaína à 1% sem adrenalina, além de, em crianças menores, se estabelecer uma sedação sistêmica com anestésico inalatório (sevoflurano inalatório).
4. Puncionar no sentido de 90° com agulha própria para mielograma (18 x 04 cm para lactentes e pré-escolares e 16 x 7,5cm para escolares/adolescentes) conectada à seringa de 5ml sem anticoagulante
5. Proceder aspiração do conteúdo medular

Punção lombar

1. O paciente será posicionado em decúbito lateral, anteflexão forçada da cabeça com contenção dos membros inferiores em flexão ou sentado com anteflexão da cabeça.
2. Será realizada antissepsia no local com solução degermante. O local da punção é o ponto referente à quarta vértebra lombar.
6. Será realizada anestesia locoregional (lidocaína1% sem adrenalina), além de, em crianças menores, se estabelecer uma sedação sistêmica com anestésico inalatório (sevoflurano inalatório).

3. Serão utilizadas agulhas 40x7 ou 40x8 e 80x8 ou 100x10 (crianças abaixo e acima de cinco anos, respectivamente), scalps 21 e 23 para recém nascido (RN).
4. Com a agulha posicionada no espaço subaracnóideo, será retirado o mandril e será feita a coleta de 2 mL de líquido.

9.6 PROTOCOLOS DE PROCESSAMENTO DE MATERIAS BIOLÓGICOS

Coloração Pela Técnica Do May Grunwald Giemsa (MGG)

A) Preparação dos reagentes

1. Reagentes necessários: solução corante MayGrunwald, solução corante Giemsa (estoque), água tamponada pH 6.8.
2. Soluções preparadas no setor de Química (vide manual de procedimento técnico do setor). Conservar em temperatura ambiente.
3. Solução corante de Giemsa (preparar no momento do uso) a 10%:
 - Solução corante Giemsa (estoque) – 1 gota
 - Água tamponada pH 6,8 – 1 ml

OBS.: Preparar a quantidade necessária de acordo com o número de lâminas a serem coradas. Cada lâmina consome cerca de 3 mL.

B) Procedimento técnico

1. Confeccionar esfregaço sangüíneo com material medular ou sangue periférico
2. Cobrir a lâmina com solução corante MayGrunwald durante 1 minuto;
3. Sobre a solução anterior, acrescentar água tamponada (pH 6.8) e homogenizar de modo a aparecer um espelho na superfície da mistura, aguardar durante 3 minutos;
4. Desprezar a mistura acima e cobrir a lâmina com a solução corante Giemsa de uso (preparada no momento de uso). Aguardar 15 minutos. Nos casos de hiperplasticidade deixar este corante durante 20 minutos;
5. Lavar em água corrente e secar a temperatura ambiente.

Análise Citogenética Convencional

A) Cultura

- 1-Meio de cultura específico para medula óssea (Marrow-Max-GIBCO);
- 2-Pingar aproximadamente 1 a 2 ml de MO em tubo cônico com o meio para medula previamente aquecido;
- 3-Suspender as células e colocar na estufa por 24 ou 48h (fazer os dois tempos para ampliar a possibilidade de acerto na resolução dos cromossomos);
- 4-Acrescentar 0,1ml de colchicina por 40 a 50 minutos;
- 5-Centrifugar a 800 rpm por 8 minutos;
- 6-Retirar o sobrenadante, seguindo a hipotonia, fixação e coloração como descrito a seguir.

B) Preparação das lâminas

Realizada dentro da capela de fluxo laminar, com temperatura de 35° C e umidade de 22 a 25%. Após a última lavagem do material, retira-se o sobrenadante, deixando um *pellet* suficiente para pingar 2 a 3 gotas em, no mínimo 2 lâminas e deixar secar a temperatura ambiente. As lâminas serão identificadas com as iniciais dos pacientes e a data da coleta. Elas serão colocadas em uma cubeta de vidro para que passem a noite em estufa de 60° C, para que “envelheçam”, tornando melhor a resolução das bandas dos cromossomos. No dia seguinte as lâminas serão coradas.

C) Coloração e bandeamento

Uma solução de tripsina EDTA será preparada (diluir 0,15mg de tripsina em 100ml de PBS) e aquecida a 37° C. As lâminas serão submergidas em três soluções diferentes: a primeira é a tripsina aquecida (a lâmina ficará de 15 a 20 segundos), a segunda conterá PBS com SBF, e a terceira conterá apenas PBS para lavagem das lâminas. Depois disto elas serão coradas com corante Giemsa (de onde deriva o nome de bandas G), diluído com água destilada a 20% de 3 a 5 minutos. Será corada uma lâmina de cada caso e observada ao microscópio para verificar

o padrão da coloração e o bandeamento, e adequar o tempo do corante e da tripsina conforme for necessário.

D) Análise ao microscópio

A análise ao microscópio é a etapa final e mais minuciosa. Serão analisadas de 15 a 20 metáfases, as imagens obtidas através da microscopia serão capturadas pelo software *Cytovision*, com resultados de acordo com as recomendações do ISCN,2009 (*Cytogenetic Nomenclature*). Os cromossomos mostram um padrão de bandas claras e escuras, no qual as faixas escuras contêm DNA rico em bases AT (adenina e timina) e poucos genes ativos; as bandas G claras têm DNA rico em bases GC (guanina e citosina) e apresentam muitos genes ativos. Tal padrão é único para cada cromossomo humano e possibilita a definição inequívoca dos cromossomos normais.

9.7 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA PESQUISA DE DRM

LABORATÓRIO DE MARCADORES CELULARES (FHEMOAM)		Clínico
PROJETO: ESTUDO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA E SUA RELAÇÃO COM CRITÉRIOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA		POP Técnico
	Nome	Rubrica
Elaborado:	Thais Salina	Código
Validado:	Elizabete Delbuono	Versão: 01
Aprovado:	Yvelize Antunes e Eliana Brasil	Data: 02/02/14
Revisado:	Yvelize Antunes e Eliana Brasil	Páginas:
		Data revisão: 02/02/14

OBJETIVO: Pesquisar por imunofenotipagem a presença de células leucêmicas residuais em amostras de pacientes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda B (LLA B) utilizando o citômetro de fluxo de 4 cores FACSCalibur, da Becton-Dickinson. **APLICAÇÃO:** Avaliar o nível de Doença Residual Mínima (DRM) em pacientes com diagnóstico de LLA B em tratamento pelo Protocolo Brasileiro de Tratamento das Leucemias na Infância (GBTLI-2009) no D8 (oitavo dia), D15 (décimo quinto dia) e D35 (trigésimo quinto dia) da terapia de indução quimioterápica.

AMOSTRA	Medula óssea colhida em EDTA
Volume Ideal	2mL
Rejeição da amostra	Amostra coagulada, congelada, coletada há mais de 24 horas ou com viabilidade inferior a 80%
Acondicionamento	Tubo a vácuo com EDTA
Estabilidade	Até 24 horas após a coleta, à temperatura ambiente
Tempo de Estocagem	Amostra total - máximo 24 horas
Conservação Imediata	Temperatura ambiente. Não refrigerar a amostra total

CONTROLE DE QUALIDADE

Cuidados com o citômetro de fluxo

A) Beads de calibração

1. Passar semanalmente os beads de calibração (*calibrite beads*) 4 cores da BD para verificação do alinhamento do laser e compensação das cores. Os beads de calibração são micro esferas adsorvidas com os fluorocromos. Os frascos deverão ser homogeneizados antes do uso.
2. Preparar 2 tubos Falcon®: no 1º tubo colocar 1 mL da solução isotônica do citômetro de fluxo e acrescentar 1 gota dos beads não marcados e 1 gota do APC; no 2º tubo colocar 3 mL da solução isotônica do citômetro de fluxo e acrescentar 1 gota dos beads marcados com FITC, 1 gota com PE, 1 gota com PERCP, 1 gota com APC e 1 gota do não marcado. Homogenizar ambos os tubos no vortex e passar no citômetro no programa FACSComp.
3. A validação da máquina para uso será feita mediante aprovação de todos os fluorocromos com seus respectivos valores médios de fluorescência.

B) Instruments settings geral da máquina (Fasctation→HD antigo→Doença Residual Mínima DRM)→Instrument Settings

1. Usar um sangue periférico (SP) normal e fazer o seguinte painel:
 - Tubo 1: Tubo controle normal (sem marcação) + 100µL de SP
 - Tubo 2: CD3 FITC (5µl) + 100µL de SP
 - Tubo 3: CD3 PE (5µl) + 100µL de SP
 - Tubo 4: CD3 PerCp (5µl) + 100µL de SP
 - Tubo 5: CD3 APC (5µl) + 100µL de SP
2. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente e no escuro
3. Lisar as hemácias com 2 mL da solução de lise caseira ou comercial.
4. Homogenizar no vortex e incubar 10 minutos nas mesmas condições acima.
5. Centrifugar 5 minutos a 1.700 rpm e desprezar o sobrenadante. Homogenizar no vortex.
6. Lavar com 2 ml de PBSA. Centrifugar 5 minutos a 1.700 rpm e desprezar o sobrenadante. Repetir o processo de lavagem.
7. Ressuspender com 500 µL de PBSA

8. Proceder a aquisição no citômetro de fluxo (CF) colocando a função *Threshold* para FSC em 52 e usar uma máscara feita no sistema Cell Quest com os seguintes dots plots: FSC x SSC, FL1 x FL2, FL2 x FL3 e FL3 x FL4 formatados para aquisição e análise
9. Abrir as demais janelas do CF (detectores, compensation, acquisition controle e amps)
10. Com o set up selecionado, iniciar a aquisição usando o tubo 1. Primeiro ajustar FSC x SSC. Para mover a população ao longo do eixo X usar FSC e para fazer o mesmo no eixo Y, usar SSC. Obs: para SP um bom ajuste é aquele onde os linfócitos ficam à esquerda em torno de 240 no eixo X, bem separado da população de monócitos cuja posição é cerca de 400 no eixo Y.
11. Fazer uma região em torno da população linfóide (R1) e formatar os outros 3 plots para aparecer apenas os eventos dentro de R1 (G1=R1). Ajustar as voltagens para FL1, FL2, FL3 e FL4, colocando a população negativa no lado esquerdo de cada gráfico. Todas as populações devem estar confinadas na 1ª década (10^1 no eixo x e 10^1 no y).
12. Colocar o tubo 2 (CD3 FITC) para aquisição. Duas populações devem aparecer: CD3 positiva (linfócitos T) e CD3 negativa (linfócitos B e NK). Desenhar 2 novas regiões ao redor de cada população (R2=G2 e R3=G3). Puxar a estatística para o plot FL1 x FL2 e formatar a estatística para “cumulative” usando a tecla “edit statistic” e iniciar os ajustes de compensação
13. Ajustar FL2-%FL1 para compensar até que a média geométrica da intensidade de fluorescência (GEO MFI) do eixo Y para CD3 FITC positivo esteja próxima a GEO MFI do CD3 negativo – em torno de 2 a 3.
14. Colocar o tubo 3 (CD3 PE) e repetir o passo acima, ajustando as duas regiões, usando FL1-%FL2. Ajustar a GEO MFI do CD3 PE positivo e negativo no eixo X – em torno de 2 a 3. Usando o mesmo tubo, fazer a compensação FL3-%FL2 usando o dot plot FL2 x FL3. Deletar região R2 e R3 e fazer novas regiões nas populações positivas e negativas (R2 e R3), puxando a estatística para este plot.

15. Ajuste FL3-%FL2 para compensar até que a média geométrica da intensidade de fluorescência (GEO MFI) do eixo Y para CD3 PE positivo esteja próxima a GEO MFI do CD3 negativo – em torno de 2 a 3.
 16. Com o tubo 4 (CD3 PERCP) faça o mesmo procedimento para compensar FL4-%FL3 e com o tubo 5 (CD3 APC) para ajustar FL3-%FL4. Lembrar de redesenhar as regiões e puxar as estatísticas para cada dot plot.
 17. Ainda com o set up selecionado, salve os Instruments Settings. Tire a seleção do set up e proceda a aquisição de 10.000 eventos de cada tubo e salve.
 18. Todos os casos de DRM deverão ser adquiridos utilizando o instruments settings padrão da máquina que deve ser revalidado com uma nova amostra de SP sempre que o citômetro for submetido à manutenção.
- OBS.: Não é necessário fazer compensação de FL2-%FL3 e os valores devem permanecer em 0,0.

C) Instruments settings para Syto-13

Syto 13 normalmente requer uma compensação FL2-%FL1 diferente do usado com FITC. Utilize um sangue periférico normal e core com Syto 13. Use este tubo para acertar a compensação FL2-%FL1. Salvar estes ajustes como Instruments settings Syto e utilizar sempre que for fazer a aquisição do tubo com este marcador.

Cuidados com os reagentes

A) PBS e PBSAZIDA

Os reagentes PBS e PBSAZIDA devem ser de uso exclusivo da DRM e devem ser filtrados com filtro millipore 0,22µm. Ademais, quando novo frasco de tais reagentes for aberto, este deve ser adquirido em citômetro de fluxo para excluir possíveis eventos contaminantes. O seguinte procedimento técnico deve ser realizado:

1. Prepare um tubo Falcon® com 1mL do reagente a ser testado
2. Adquirir o material no citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando o instrument settings para 4 cores durante 300 segundos (ACQUISITION E STORAGE → COLLECTION CRITERIA → EVENT COUNT OR TIME)

3. O número de partículas aceitáveis deverá ser menor que 50 em 5 minutos

B) SYTO-13(Invitrogen)- Molecular probes S7575

- 1- Manter solução estoque $\leq -20^{\circ}\text{C}$
- 2- Para uso, descongele a temperatura ambiente
- 3- Centrifugue por 5 minutos a 15.000 rpm para trazer o DMSO para o fundo do tubo.
- 4- Faça uma diluição de 1/1000 (1 μL Syto 13 +999 μL PBSA) sendo cuidadoso para não aspirar DMSO
- 5- Passe a mistura no vortex
- 6- Use 0,5 μL para 1 milhão de células .Novos lotes de Syto 13 precisam ser retitulados .
- 7- Manter a diluição de Syto 13 em alíquotas a -20°C (25 - 30 μL) que é estável por 6 meses. Pode também se estocado por aproximadamente 1 mês a 4°C para uso diário.
- 8- A solução estoque resiste a vários congelamentos e descongelamentos e é estável por aproximadamente 1 ano.

Notas:

- Syto 13 não pode ser fixado em 0,5% de paraformaldeído, que resulta em perda de sinal.
- As células após coradas devem ser adquiridas no citômetro de fluxo o mais rápido possível e pode ser mantido em gelo por 30 minutos.

Cuidados com a técnica

Problema	Resultado	Prevenção/Solução
Contaminação da amostra	Falso positivo	-Manipulação e rotulagem cuidadosa
Impurezas no sistema, nas soluções de uso e no sistema de fluidos do CF	Falso positivo	-Filtrar as soluções de uso em filtro millipore -Limpeza do citômetro - Limpar a probe com um lenço de papel na troca dos tubos
Ligação inespecífica de anticorpos	Falso positivo	-Saturar os receptores de Fc -Titulação cuidadosa de todos os anticorpos - Usar isotipo controle correspondente (IgG-1)
Inclusão de AcMo em tubo errado ou contaminação	Falso positivo ou negativo	-Armazenamento lógico e ordenado dos AcMo -Rotulagem clara dos tubos -Usar um "coquetel" de AcMo previamente preparado - Evitar distrações durante o procedimento
Mudança no lote de AcMo /ou instabilidade do instrumento de análise	Falso positivo ou negativo	- Análise frequente de amostras de controles normais -Teste periódico das configurações do instrumento de análise
Mudanças no imunofenótipo	Falso negativo	-Uso de combinações de múltiplos AcMo
Amostras provenientes de áreas negativas da MO	Falso negativo	- Coleta de amostras da MO em diferentes sítios
Erro de leitura das células adquiridas	Falso negativo ou positivo	- Adquirir na velocidade média

Materiais necessários

Item	Equipamentos
1	Centrífuga de bancada
2	Vortex
3	Citômetro de fluxo FACSCalibur
4	Contador eletrônico de leucócitos

Item	Descrição
	Soluções e demais materiais
1	Solução tampão PBS Ph=7,4
2	Solução tampão PBS Azida
3	Solução de Lyse: FACS Lysing®
4	Pipetadores automáticos: -0,5-10µL - 20µL - 200µL
5	Ponteiras
6	Filtro millipore 0,22µm
7	Tubos de poliestireno 12X75mm para citometria (Falcon®)

Item	Descrição
	Anticorpos monoclonais
1	IgG1 FITC
2	IgG1 PE
3	IgG1 PerCP
4	IgG1 APC
5	CD45 FITC
6	CD10 PE
7	CD34 PerCP
8	CD19 APC
9	CD13 FITC
10	CD33 FITC
11	CD15 FITC
12	CD38 FITC
13	CD58 FITC
14	CD66c FITC
15	Syto 13
16	TdT FITC
17	CD3c PerCP

Processamento das amostras para marcação celular por imunofenotipagem dos antígenos de superfície celular

1. Contar células em plataforma Advia® 2120i, para avaliar a celularidade do material. A leucometria deverá ser ajustada para 10.000 células a fim de utilizar 100 µL.
2. Lavar a amostra com PBS contendo 5% de soro fetal bovino, três vezes, para reduzir a ocorrência de reações inespecíficas. Na última lavagem, ressuspender o pellet de células com PBS ou PBS-W (PBS com azida sódica).
3. Identificar os tubos de hemólise (Falcon®) apropriados para o uso no CF com os AcMo a serem utilizados no painel de triagem para definição do subtipo celular.
4. Adicionar 100 µL da amostra
5. Adicionar o volume adequado para os AcMo
6. Homogenizar no vortex e incubar por 15 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz
7. Proceder a lise das hemácias seguindo protocolo do fabricante do kit para lise celular
8. Homogenizar no vortex e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz
9. Centrifugar por 5 minutos a 1700rpm
10. Desprezar o sobrenadante por inversão
11. Ressuspender o pellet no vortex e acrescentar 2mL de PBS-W
12. Centrifugar por 5 minutos a 1700rpm. Repetir os passos 10 e 11.
13. Desprezar o sobrenadante por inversão, ressuspender em 500 µL de PBS-W. Fazer aquisição no CF FACSCalibur utilizando uma máscara elaborada no software CellQuest e os Instruments Settings para garantia da qualidade.

Processamento das amostras para marcação celular por imunofenotipagem dos antígenos intracitoplasmáticos e nucleares

1. Para cada amostra que será analisada, adicionar o volume apropriado do anticorpo conjugado direcionado para os marcadores de superfície celular de interesse, e/ou o isotipo controle para um tubo apropriado de 5 mL com 12 x 75 mm.
2. Pipetar 100 μ L da amostra ou ajustar células equivalente a 1×10^6 células, em cada tubo.
3. Homogenizar no vórtex, incubar por 15 minutos no escuro e temperatura ambiente.
4. Adicionar 100 μ L do reagente A (Fixação) e incubar por 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente.
5. Lavar uma vez com 3 mL de PBS-W (PBS + 0.1% NaN_3 + 5% FBS).
6. Centrifugar por 5 minutos a 1.500 ou 1.700 rpm, aspirar sobrenadante e colocar no vortex para resuspender totalmente o pellet celular.
7. Adicionar 100mL do reagente B (Permeabilização) e o volume recomendado dos anticorpos intranucleares ou do correspondente isotipo controle.
8. Colocar no vórtex por 1–2 segundos e incubar por 20 minutos no escuro e temperatura ambiente.
9. Lavar uma vez com 3 mL de PBS-W (PBS + 0.1% NaN_3 + 5% FBS).
10. Centrifugar por 5 minutos a 1.500 ou 1.700 rpm e aspirar o sobrenadante.
11. Resuspender as células em solução salina para análise imediata.

Procedimento técnico para definição do padrão de fluorescência dos antígenos anômalos na medula óssea normal

Utilizar um aspirado de medula óssea normal e proceder à marcação das células conforme técnica já padronizada e descrita acima.

1. Preparar os seguintes tubos Falcon®:

Fluorocromo	FITC	PE	Percp	APC
Tubo 1	CD13 (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)
Tubo 2	CD33 (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)
Tubo 3	CD66c (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)
Tubo 4	CD15 (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)
Tubo 5	CD38 (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)
Tubo 6	CD45 (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)
Tubo 7	CD58 (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)

2. Adquirir o maior número de eventos possíveis na máscara de aquisição de DRM para LLA B (mínimo de 100.000 eventos). A amostra utilizada deve conter > 0,5% de células duplo-positivas para CD19 e CD34 (hematogônias).
3. Abrir a máscara de análise correspondente ao marcador anômalo de cada tubo e verificar se o padrão de expressão do marcador em questão se distribui conforme o padrão de normalidade.

Obs.:Caso o padrão dos marcadores anômalos dessa amostra não se adéque as regiões de normalidade, ajustar as regiões para a amostra em questão.

4. Salvar a máscara ajustada e utilizá-la para análise da DRM para LLA B no D35 da Terapia de Indução do protocolo GBTLI-2009.

OBS.: CD13, CD33 e CD66c são sempre negativos na população CD19 e CD34 positivas e CD15 pode ser fracamente expresso.

Procedimento técnico para definição do marcador anômalo ao diagnóstico

1. Ao diagnóstico, a amostra será submetida a um amplo painel de AcMo (Flow Cytometry Kits BD) de triagem (quadro 1) para determinar a linhagem da população celular de blastos, promovendo o diagnóstico diferencial entre LLA B, LLA T e Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Toda a marcação celular deverá seguir a técnica já padronizada e descrita acima.
2. Nos casos em que o painel de triagem evidenciar LLA B, será realizado um painel complementar para sua respectiva subclassificação e determinação do fenótipo anômalo associado à leucemia, que será utilizado no monitoramento da DRM. No quadro 2 estão relacionados os marcadores anômalos para LLA B.
3. Será testado individualmente cada marcador anômalo para LLA B. Inicialmente, serão adquiridos 10.000 eventos e, nos tubos com marcadores anômalos presentes, serão acrescentados CD10, CD34 e CD19 para LLA B (quadro 4) e, exclusivamente para estes tubos, será realizada nova aquisição de 10.000 eventos sobrepondo a aquisição realizada isoladamente.
4. A seleção do fenótipo anômalo pelos marcadores de intensidade de fluorescência (CD45, CD38 e CD58) é visual e comparativa com gráfico de expressão normal de cada um desses marcadores na medula óssea.
5. A seleção do fenótipo anômalo pelos marcadores de infidelidade de linhagem (CD15, CD65, CD33, CD13 e CD66c) se dá pela sua simples positividade na amostra analisada, independente da sua intensidade de expressão.

Quadro 1: Painel de triagem das leucemias ao diagnóstico

Fluorocromo	FITC	PE	Percp	APC
Tubo 1	Controle negativo	-----	CD45 (5uL)	-----
Tubo 2	cMPO (5uL)	CD79a (5uL)	CD45 (5uL)	clgM (5uL)
Tubo 3	cCD3 (5uL)	CD7(5uL)	CD45 (5uL)	CD22 (5uL)

Quadro 2: Painel de marcadores anômalos para LLA B

Parâmetro	Marcador	Normal	Anômalo
Intensidade da expressão	CD45	Fraca intensidade	Negativo
	CD38	Forte intensidade	Fraca intensidade
	CD58	Fraca intensidade	Forte intensidade
Infidelidade de linhagem	CD13	Ausente	Presente
	CD33	Ausente	Presente
	CD66c	Ausente	Presente
	CD15	Ausente	Presente
	CD65	Ausente	Presente

Quadro 4: Painel complementar para LLA B

Fluorocromo	FITC	PE	Percp	APC
Tubo 1 (controle)	-----	-----	-----	CD19 (4uL)
Tubo 2	CD45 (5uL)	CD10 (5uL)	CD34 (5uL)	CD19 (4uL)
Tubo 3	HLA-DR (5uL)	-----	CD19 (5uL)	slg (5uL)
Tubo 4	Marcador anômalo (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)

Procedimento técnico para detecção da DRM no D8 e D15 na LLA B

1. Preparar 3 tubos e colocar em cada um deles o equivalente a 1 milhão de células. Proceder à marcação das células conforme técnica já padronizada e descrita acima.

Fluorocromo	FITC	PE	Percp	APC
Tubo 1 (viabilidade)	0,5uL Syto 13 (diluição 1:1000)	-----	-----	CD19 (4uL)
Tubo 2 (DRM)	CD45 (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)
Tubo 3 (controle)	CD45 (20uL)	IgG1 (20uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)

2. Fazer a aquisição de 10.000 eventos totais (*no gate*), na máscara de imunofenotipagem dos 3 tubos acima. Utilize o *Instrument Setting* padrão da máquina para adquirir o tubo 2 (DRM) e tubo 3 (controle) e o *Instrument Setting* para Syto para adquirir o tubo 1.

3. Adquirir DRM usando a máscara de aquisição da DRM para no LLA B. O tubo 2 se torna tubo 4 e o tubo 3 se torna tubo 5. Adquirir quantos eventos forem possíveis. Anotar no final de aquisição, o número total de eventos.

4. Analisar o Syto 13 na máscara de análise (Syto para LLA B), da seguinte forma:

4.1 No gráfico FSC (eixo x) x Syto 13 (eixo y) puxar os dados da aquisição do tubo 1, conforme descrito no item 2. Ajustar a região R2=G2 de modo a conter toda a população viável de células (Syto positivas). Anotar a estatística da região R2 do tubo 1.

4.2 No gráfico CD19 APC (eixo x) x SSC (eixo y) e FSC x SSC, puxar os dados referentes à aquisição do tubo 1 (Syto 13 x CD19 APC) conforme item 2. Ajustar a região R1=G1 de modo a conter toda a população CD19 positiva. Puxar a estatística do tubo 1.

4.3 Em outros dois dots plots, com os mesmos parâmetros, puxar os dados referentes à aquisição do tubo 2 (tubo da DRM) conforme item 2. O ajuste da região está ligado ao ajuste feito no item anterior. Puxar a estatística do tubo 2.

4.4 Proceder o cálculo dos fatores de correção:

$FC1 = \text{Número total de eventos (10.000)} / \text{número de total de células viáveis (eventos em R2) do Tubo 1}$

$FC2 = FC1 \times \text{número de células CD19 verdadeiras (\% total em R1 do tubo 1)} / \text{número de células CD19 diluídas ou mortas do tubo 2 (\% total em R1 do tubo 2)}$.

5. Para calcular a DRM, proceder da seguinte forma:

5.1 Na máscara de análise da DRM, referente ao D8 e D15, puxar os dados da aquisição do tubo 4;

5.2 Ajustar a região R1=G1 no gráfico FSC x SSC de modo a conter toda a população de baixa SSC, distribuída ao longo do eixo FSC;

5.3 No gráfico CD10 (eixo x) x CD19 (eixo y) fazer a região R2=G2 na população CD10 e CD19 positiva ou CD34 e CD19 positiva (nos casos em que o CD10 for negativo).

5.4 Em outro gráfico FSC x SSC, desenhar uma região R3 ao redor das células que são resultado da estratégia de associação das regiões R1 e R2 (G3), que resultaram nas células CD10, CD19 positivas ou CD19 com CD34 positivas.

5.5 No gráfico CD45 x CD19, fazer a região R4 na população CD19 positiva e CD45 positiva de baixa intensidade. Puxar a estatística das regiões (R1, R2, R3, R4)

5.6 Fazer a mesma análise para o tubo 5 (eventos inespecíficos)

5.7 Para o cálculo, proceder da seguinte forma:

5.7.1 Subtrair o total de eventos dentro da região R4 (tubo 4- DRM-) do total de eventos da mesma região do tubo 5 (tubo controle). Dividir o resultado da subtração pelo número total de eventos adquiridos no tubo 4 e multiplicar por 100. O número resultante é a DRM sem correção.

5.7.2 Para efetuar a correção, multiplicar o resultado obtido na operação matemática acima pelo FC2 (item 4.4). O resultado será a DRM só considerando as células viáveis (%). O resultado é expresso da seguinte forma:

DRM negativa: “DRM menor que 0,01%”

DRM positiva: "DRM = X%"

Obs.: Para os casos onde não for possível adquirir no mínimo 100 mil eventos, a sensibilidade da técnica cai para 0,1% devendo ser referido no laudo.

Procedimento técnico para detecção da DRM no D35 LLA B

1. Preparar a quantidade de tubos necessários na dependência do número de marcadores anômalos da amostra e colocar em cada um deles o equivalente a um milhão de células. Proceder à marcação das células conforme técnica já padronizada e descrita acima

Fluorocromo	FITC	PE	Percp	APC
Tubo 1 (viabilidade)	0,5uL Syto 13 (diluição 1:1000)	-----	-----	CD19 (4uL)
Tubo 2 (DRM)	Marcador anômalo (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)
Tubo 3 (controle)	IgG1 (20uL)	CD10 (15uL)	CD34 (15uL)	CD19 (4uL)

Obs.: Poderá haver mais de um marcador anômalo definido ao diagnóstico. Neste caso, seguir a sequência numérica dos tubos a partir do tubo 2 e o tubo controle será sempre o último.

2. Fazer a aquisição de 10.000 eventos totais (*no gate*), na máscara de imunofenotipagem dos 3 tubos acima. Utilize o *Instrument Setting* padrão da máquina para adquirir o tubo 2 (DRM) e tubo 3 (controle) e o *Instrument Setting* para Syto para adquirir o tubo 1.

3. Adquirir DRM usando a máscara de aquisição da DRM para no LLA B. O tubo 2 se torna tubo 4 e o tubo 3 se torna tubo 5 e assim, sucessivamente. Adquirir quantos eventos forem possíveis. Anotar no final de aquisição, o número total de eventos.

4. Analisar o Syto 13 na máscara de análise (Syto para LLA B), da seguinte forma:

4.1 No gráfico FSC (eixo x) x Syto 13 (eixo y) puxar os dados da aquisição do tubo 1, conforme descrito no item 2. Ajustar a região R2=G2 de modo a conter toda a população viável de células (Syto positivas); Puxar a estatística do tubo 1 (R2).

4.2 No gráfico CD19 APC (eixo x) x SSC (eixo y) e FSC x SSC, puxar os dados referentes a aquisição do tubo 1 (Syto 13 x CD19 APC) conforme item 2. Ajustar a região R1 de modo a conter toda a população CD19 positiva. Puxar a estatística do tubo 1.

4.3 Em outros dois dots plots, com os mesmos parâmetros, puxar os dados referentes à aquisição do tubo 2 (tubo da DRM) conforme item 2. O ajuste da região está ligado ao ajuste feito no item anterior. Puxar a estatística do tubo 2.

4.4 Proceder o cálculo dos fatores de correção:

FC1 = Número total de eventos (10.000) / número de total de células viáveis (eventos em R2) do Tubo 1

FC2 = FC1 x número de células CD19 verdadeiras (% total em R1 do tubo 1) / número de células CD19 diluídas ou mortas do tubo 2 (% total em R1 do tubo 2).

5. Para calcular a DRM, proceder da seguinte forma:

5.1 Na máscara de análise da DRM no D35, referente ao marcador anômalo (CD58, CD45, CD38, CD66c, CD15, CD13 e/ou CD33), puxar os dados da aquisição do tubo correspondente;

5.2 Ajustar a região R1=G1 no gráfico FSC x SSC de modo a conter toda a população de baixa SSC, distribuída ao longo do eixo FSC;

5.3 No gráfico CD34 (eixo x) x CD19 (eixo y) ajustar regiões R2=G2 na população CD34 e CD19 positivas e R3=G3 na população CD19 positiva, CD34 negativa.

5.4 Para os marcadores anômalos cuja análise for baseada na intensidade de fluorescência (CD45, CD38 e/ou CD58), fazer uma ou mais regiões na população que estiver fora das regiões previamente padronizadas que se baseiam na expressão normal do referido marcador anômalo. Esta região será feita no gráfico do marcador anômalo (eixo x) x CD10 (eixo y), na população CD10 positiva.

5.5 Puxar a estatística deste gate que contemplará em um dos gráficos a população CD34, CD19, CD10 positivas com CD38 positivo de fraca intensidade ou CD58 positivo de forte intensidade ou CD45 negativo e, no outro gráfico, a população CD34 negativa, CD19 e CD10 positivas com CD38 positivo de fraca intensidade ou CD58 positivo de forte intensidade ou CD45 negativo.

5.6 Para os marcadores anômalos cuja análise for baseada na infidelidade de linhagem (CD13, CD33, CD15 e/ou CD66c), fazer uma ou mais regiões na população que expressar CD10 e marcador anômalo em qualquer intensidade de fluorescência no gráfico marcador anômalo (eixo x) x CD10 (eixo y). Puxar a estatística deste gate que contemplará, em um dos gráficos, a população CD34, CD19, CD10 e marcador anômalo positivas e, no outro gráfico a população CD34 negativa, CD19, CD10 e marcador anômalo positivas.

5.7 Fazer a mesma análise para o tubo controle (eventos inespecíficos). Para os marcadores cuja expressão anômala é uma fraca intensidade de fluorescência (CD38) ou negatividade (CD45), os eventos inespecíficos não devem ser descontados.

5.8 Para o cálculo, proceder da seguinte forma:

5.8.1 Subtrair o total de eventos dentro da região recém construído (contém a população anômala) do total de eventos da mesma região do tubo controle. Dividir o resultado da subtração pelo número total de eventos adquiridos no tubo do respectivo marcador anômalo e multiplicar por 100. O número resultante é a DRM sem correção.

Obs.: Caso mais de uma região seja desenhada, os eventos deverão ser somados.

5.8.2 Para efetuar a correção, multiplicar o resultado obtido na operação matemática acima pelo FC2 (item 4.4). O resultado será a DRM só considerando as células viáveis (%).

O resultado é expresso em % da seguinte forma:

DRM negativa: "DRM menor que 0,01%"

DRM positiva: "DRM = X%"

Obs.: Para os casos onde não for possível adquirir no mínimo 100 mil eventos, a sensibilidade da técnica cai para 0,1% devendo ser referido no laudo.